

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

ÁCS ZOLTÁN

**KAPOSVÁRI EGYETEM
AGRÁR- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR**

DOI:10.17166/KE2016.010

2016

KAPOSVÁRI EGYETEM
AGRÁR- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
Környezettudományi és Természetvédelmi Intézet

A Doktori Iskola vezetője:
Dr. KOVÁCS MELINDA
az MTA levelező tagja

Témavezető:
Prof. Dr. SUGÁR LÁSZLÓ CSc
egyetemi tanár, professzor emeritus

**SZARVASFÉLÉK *Dictyocaulus* Tüdőférgének
ELŐFORDULÁSI JELLEMZŐI ÉS
GAZDAFAJLAGOSSÁGA DNS VIZSGÁLATOK
SEGÍTSÉGÉVEL**

Készítette:
ÁCS ZOLTÁN

Kaposvár

2016

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|----|
| JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 3 |
| 1. BEVEZETÉS..... | 5 |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS..... | 7 |
| 2.1. A tüdőférgesség jelentősége | 7 |
| 2.1.1. Tüdőféreg fertőzések szarvasfélékben..... | 8 |
| 2.1.1.1. Hazai irodalom | 9 |
| 2.1.1.2. Külföldi irodalom | 11 |
| 2.1.2. Tüdőféreg-fertőzöttség egyéb gazdaállatokban..... | 13 |
| 2.2. Tüdőféreg rendszerezése | 15 |
| 2.2.1. Magasabb rendű rendszertani viszonyok..... | 15 |
| 2.2.2. <i>Dictyocaulus</i> morfológia és taxonómia | 17 |
| 2.2.3. Molekuláris filogenetika..... | 19 |
| 2.2.4. <i>Dictyocaulus</i> fajokra vonatkozó molekuláris rendszertani kutatások | 22 |
| 2.3. <i>Dictyocaulus</i> férgek gazda-fajlagossága | 26 |
| 2.3.1. Morfológiai fajazonosítással alátámasztott gazda-parazita kapcsolatok | 26 |
| 2.3.2. Fertőzési kísérletek | 30 |
| 2.3.3. Molekuláris vizsgálatokkal alátámasztott gazda-parazita kapcsolatok | 32 |
| 2.4. Tüdőféreg életciklusa | 34 |
| 2.5. Tüdőférgesség kórtana..... | 37 |
| 2.6. Védekezési lehetőségek a dictyocaulosis ellen | 40 |
| 2.7. Tüdőféreg populációgenetikája | 46 |
| 3. A DISSZERTÁCIÓ CÉLKITŰZÉSEI..... | 50 |
| 4. ANYAG ÉS MÓDSZER..... | 51 |
| 4.1. Hazai szarvasfélékben élő tüdőféreg faji azonosítása | 53 |
| 4.1.1. A vizsgálati anyag begyűjtése | 53 |
| 4.1.3. DNS vizsgálatok | 58 |
| 4.1.3.1. DNS kivonás..... | 58 |
| 4.1.3.2. PCR..... | 58 |
| 4.1.3.3. PCR termék tisztítása..... | 61 |
| 4.1.3.4. DNS szekvenciák..... | 62 |
| 4.1.4. Tüdőféreg fajok azonosítása..... | 65 |
| 4.2. Filogenetikai elemzés | 65 |
| 4.3. <i>Dictyocaulus</i> fajokat elkülönítő PCR alapú módszer | 67 |
| 4.4. Gazdafajlagosság | 69 |
| 4.5. Populációgenetikai elemzések..... | 69 |
| 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEŚÜK..... | 73 |
| 5.1. Morfológia..... | 73 |

| | |
|--|-----|
| 5.2. DNS szekvenciák | 73 |
| 5.2.1. Nukleáris riboszomális gén intron 2 (ITS2)..... | 74 |
| 5.2.2. Mitokondriális citokrom c oxidáz 1 alegység gén (cox1)..... | 78 |
| 5.2.3. Nukleáris riboszomális RNS kis alegység gén (18S rDNS) | 85 |
| 5.2.4. Nukleáris riboszomális RNS nagy alegység gén (28S rDNS) | 87 |
| 5.2.5. Sejtmagi „Major Sperm Protein 1” gén (MSP1)..... | 91 |
| 5.3. Filogenetikai viszonyok | 94 |
| 5.3.1. <i>Dictyocaulus</i> nemen belüli, fajok közötti evolúció becslése | 94 |
| 5.3.2. <i>Dictyocaulus</i> nem magasabb rendű filogenetikai viszonyai | 98 |
| 5.4. <i>Dictyocaulus</i> fajokat elkülönítő PCR alapú módszer | 99 |
| 5.5. Gazda-parazita kapcsolatok | 102 |
| 5.6. Magyarországi szarvasok tüdőférgének populációgenetikája | 106 |
| 5.6.1. cox1 szekvencia elemzés | 107 |
| 5.6.2. Genetikai diverzitás..... | 110 |
| 5.6.3. Genetikai struktúra és génáramlás | 111 |
| 5.6.3.1. A földrajzilag elkülönített <i>Dictyocaulus</i> populációk genetikai strukturáltsága | 113 |
| 5.6.3.2. Gazdaegyedenkénti féregpopulációk genetikai elkülönülése ... | 115 |
| 5.6.3.3. Génáramlás gazdafaj szerint elkülönített populációk között | 116 |
| 5.6.4. Populáció történet | 116 |
| 5.6.5. Populációgenetikai összefüggések..... | 120 |
| 6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK | 129 |
| 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK | 135 |
| 8. ÖSSZEFOGLALÁS..... | 137 |
| 9. SUMMARY | 142 |
| 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 147 |
| 11. IRODALOMJEGYZÉK..... | 148 |
| 12. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉBŐL MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK..... | 162 |
| 13. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉN KÍVÜLI PUBLIKÁCIÓK | 164 |
| 14. SZAKMAI ÉLETRAJZ | 169 |
| 15. MELLÉKLETEK..... | 170 |

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|-----------------------------------|---|
| 18S rDNS | 18S riboszomális RNS gén |
| 28S rDNS | 28S riboszomális RNS gén |
| 5,8S rDNS | 5,8S riboszomális RNS gén |
| AFLP | Amplified Fragment Length Polymorphism / amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus |
| AIC | Akaike Information Criterion / Akaike-féle információs ismérték |
| AT | adenin és timin nukleotidok |
| BIC | Bayesian Information Criterion / Bayes-féle információs ismérték |
| bp | bázispár |
| CI | Confidence Interval / konfidencia intervallum |
| cox1 | citokróm c oxidáz 1 alegység gén |
| ddH ₂ O | bidesztillált víz |
| DNS | dezoxiribonukleinsav |
| dNTP | di-Nukleotid-Tri-Foszfát |
| ELISA | Enzim Linked ImmunoSorbent Assay / szilárdfázisú enzimjelzéses immunoanalitikai eljárás |
| F_{ST} , G_{ST} , N_{ST} | fixációs indexek |
| GC | guanin és citozin nukleotidok |
| <i>Hd</i> | haplotípus diverzitás |
| ITS2 | Internal Transcribed Spacer 2 |

| | |
|----------------|--|
| <i>K</i> | átlagos nukleotid különbség |
| L1, L3, L4, L5 | első-, harmadik-, negyedik-, ötödik stádiumú lárva |
| <i>m</i> | migrációs ráta |
| ML | Maximum Likelihood |
| MOTU | Molecular Operational Taxonomic Unit / molekuláris taxonómiai operatív egység |
| MP | Maximum Parsimony |
| MSP1 | Major Sper Protein 1 alegység |
| NJ | Neighbor Joining |
| ORF | Open Reading Frame / nyitott olvasási keret |
| PCR | Polymerase Chain Reaction / polimeráz láncreakció |
| RAPD | Random Amplification of Polymorphic DNA / polimorfikus DNS véletlenszer sokszorosítása |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism / restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus |
| RNS | ribonukleinsav |
| SNP | single-nucleotide polymorphism / egyponyos nukleotid-polimorfizmus |
| SSCP | Single Strand Conformation Polymorphism / egyszálú DNS konformációs polimorfizmus |
| TE | Trisz-EDTA |
| tMRCA | Time to Most Recent Common Ancestor / legközelebbi közös őstől való elválás ideje |
| π | nukleotid diverzitás |

1. BEVEZETÉS

A *Dictyocaulus* nembe tartozó tüdőférgek parazita fonálférgek (Nematoda, Strongylida, Trichostrongyloidea, Dictyocaulidae), amelyek gyakran betegséget okoznak különböző kérődző emlősökben, lófélékben (Berrag és Urquhart, 1996, Wimmer és mtsai, 2003). Sok országban jelentős állategészségügyi problémát jelentenek. Szarvasmarhában a *D. viviparus*, juhfélekben a *D. filaria* okozhat esetenként halálos kimenetelű hörghurutot. A háziállatok közt szórványosan kialakuló dictyocaulosis járványok oktana nem teljesen tisztázott, egyesek szerint a vadon élő kérődzők szolgálnak rezervoárként e parazitáknak.

A szarvasféleknek kiemelkedő jelentősége van a hazai vadgazdálkodásban. A szarvasfélék (Cervidae) sokféle parazitája közül – hazánkban potenciálisan mintegy 100 parazita faj (Sugár és mtsai, 2006) – a tüdőférgeket tartják a legfontosabbaknak, főként vadaskerti tartásnál (Sugár, 1997; Johnson és mtsai, 2004). A *D. eckerti* tüdőféreg a legfontosabb parazita a gímszarvas kertekben, melynek jelentős gazdasági vonatkozásai is lehetnek. A dictyocaulosis enyhébb fertőzőskor növekedésbeli visszaesést, míg súlyosabb esetben elhullást okozhat. Az Európában vadon élő kérődzőkben a fenti 3 fajon kívül még a *D. capreolus* faj fordul elő.

A Magyarországon vadon élő szarvasokban előforduló nagy tüdőférgekkel Sugár (1990, 1995, 1997) folytatott vizsgálatokat. A morfológiai jellegek vagy gazdafaj ismeretek alapján elnevezett tüdőférgek fajnevei valószínűleg nem a biológiai fajokat jelölik. A morfológiailag nehezen, vagy nem elkülöníthető biológiai fajok azonosítása DNS vizsgálatokkal megbízhatóbb. A magyarországi *Dictyocaulus* férgekkel korábban még nem végeztek molekuláris

vizsgálatokat. DNS vizsgálatokkal nemcsak a küllemileg hasonló fajok különíthetők el, hanem ezáltal populációs viszonyaikra, filogenetikai rokonságukra, gazda-parazita kapcsolataikra is fény derülhet. E témaválasztás nemzetközi viszonylatban is érdeklődésre tarthat számot. Annak ellenére, hogy a világon elterjedt a *Dictyocaulus* nem, és gazdasági vonatkozása miatt számos kutatás célpontja volt, a létező fajok elkülönítéséről, elterjedéséről nem sokat tudunk. Pedig a tüdőférges biológiájának megismeréséhez elengedhetetlenül szükséges a vizsgálat tárgyát képező biológiai objektum pontos megismerése, megnevezése, hogy a megismert tulajdonságokat tudjuk mihez rendelni. Ehhez elengedhetetlen a biológiai fajok egyértelmű elhatárolása. A jelenleg használatos féreghajtó szerekkel szembeni rezisztencia, legalábbis a gyomor-bélférges (Trichostrongylidae) esetében, széleskörűen elterjedt és gyakori, ami alternatív védekezési módszerek keresését teszi szükségessé. A tüdőférgesről való ismereteink bővülésével lehetőség nyílik az életciklusuk gyenge pontjainak megtalálására és a védekezési módszerek fejlesztésére. A tüdőfereg fajok elkülönítése, biológiájuk megismerése még számos ismeretet igényel, amelyek hozzájárulhatnak a dictyocaulosis tüdőférgesség megértéséhez, megelőzéséhez és kezeléséhez.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A tüdőférgesség jelentősége

A *Dictyocaulus* nembe tartozó tüdőférgek parazita fonálférgek (Nematoda törzs, Strongylida rend, Dictyocaulidae család), amelyek gyakran okoznak betegséget különböző kérődző emlősökben, lófélékben, főként a mérsékelt éghajlati övben. Különösen a párás időjárás kedvez a lárvák felvételéhez (fertőződéshez, újra-fertőződéshez). Enyhébb fertőzéskor növekedésbeli visszaesést okoz, míg súlyosabb esetben akár a gazdaállat elhullását is. Szarvasmarha, bivaly, juh, kecske és szarvas állományokban a nagy tüdőférgek halálos kimenetelű hörghurutot okozhatnak, aminek jelentős gazdasági következményei vannak. Woolley (1997) becslése szerint egy átlagos angliai, 100 tehenes telepen egy közepes dictycaulosis fertőzés 30-40.000 Euro veszteséggel jár. A szarvasfélék (Cervidae) parazitái közül általában csak a tüdőférgeket tartják kórtani jelentőségűeknek. Vadaskertekben, szarvasfarmokon a dictyocaulosis a legfontosabb makroparazitikus fertőzőtség.

A legnagyobb gazdasági kárt a szarvasmarha telepeken okozzák a *Dictyocaulus* férgek, de a juh és kecske állományokban is jelentős lehet a kár. A fertőzőtség rendszerint enyhe lefolyású, de az állatok súlyos leromlásával, elhullásokkal járó, állományszintű megbetegedések alakjában is jelentkezhet (Kassai és mtsai, 1974).

A kérődzők, lófélék tüdejében a *Dictyocaulus* fajokon (magyar elnevezésük: tüdőszőrférgek vagy nagy tüdőférgek) kívül egyéb férgek is előfordulnak. A gócos tüdőférgek 0,5-6 cm hosszúságú hajszálvékony **Protostrongylidae** családba tartozó fonálférgek, amelyek a tüdőszövetben, többnyire légtelen gócokban élőködnek. Köztigazdái különböző szárazföldi házas, és házatlan csigák. A gócos tüdőférgek

klinikai tüneteket csak ritkán okoznak a gazdaállatban. Gímszarvasban (*Cervus elaphus*) a *Varestrongylus sagittatus*, őzben (*Capreolus capreolus*) a *V. capreoli* fordul elő. Juh és kecske tüdejében több egyéb faj élőskeződhet (Kassai, 1999). A Protostrongylidae családon belül az izompólyákban élő Elaphostrongylinae alcsaládba tartozó fajok lárvái a vérből a tüdőkapillárisok falán átjutva, a tüdő légjáratain át jutnak a garatüregbe, onnan a gyomor-béltraktusba, majd ürülékkel a külvilágba. Az *Elaphostrongylus cervi* a szarvasok ún. kötőszöveti férgé. Hazai gímszarvasokban gyakori, ritkábban őzben és dámban is előfordul. A kifejlett férgek többnyire a mellkas és a lapocka közötti laza kötőszöveti pólyákban találhatók. Egy hazai szarvasfarmon tartott másodéves gímekben az *E. cervi* lárvaurítás prevalenciája 91,4 %-os volt (Sugár, 1995). Az erősen fertőzött gazdában enyhe tüdőgyulladást okozhat a nagyszámú lárv (Rezác és Blazek, 1991).

2.1.1. Tüdőféreg fertőzések szarvasfélékben

A Dictyocaulidae és Protostrongilidae nematoda fertőzések általánosan elterjedtek az Európában, Ázsiában és Észak-Amerikában élő szarvasokban (Bergstrom, 1983). Az ilyen fertőzéseknek többnyire nincs kóros megnyilvánulása, vélhetően a szabad területen végbemenő biológiai szabályozó folyamatoknak köszönhetően. A különböző stressz hatásoknak kitett vagy egyéb okból csökkent immunműködésű állatok között azonban megbetegedés alakulhat ki, különösen intenzív körülmények közt tartott szarvasoknál (Fletcher, 1982). A protostrongylida tüdőférgék csak ritkán okoznak patológiai elváltozást a gazdaállatban.

Az európai őzekben is általánosan elterjedtek a nagy- és a gócos tüdőférgék. Gazdasági jelentősége e legkisebb európai szarvasfélének is

számottevő (Linnell és Andersen, 1998). Svédországban a szarvasmarha tüdőférges jelentős gazdasági kárt okoz. A vadon élő szarvasféléktől való fertőződésük lehetősége miatt a szarvasok tüdőférgesit is intenzíven vizsgálták, ahol e férgek szintén gyakori paraziták. Svédországban a szabadon élő szarvasfélék állománya jelentős: mintegy 1,2-1,6 millió őz, és kb. 300-400 ezer jávorszarvas (Divina és mtsai, 2002), míg gím-, dám- (*Dama dama*) és rénszarvas (*Alces alces*) kisebb számban él.

Feltehetően egyéb szarvasfélékben (Cervidae) és tülkösszarvúakban (Bovidae) is élnek tüdőférgesek. Jelenleg 54 szarvasféle fajt tartanak nyilván, közülük csak az európai és észak-amerikai szarvasok tüdőférgesit vizsgálták. Az egyéb szarvas fajok tüdőférgesiről nincs, vagy csak alig van ismeretünk.

2.1.1.1. Hazai irodalom

A Magyarországon vadon élő szarvasokban élő nagy tüdőférgesekkel Sugár (1995, 1997) folytatott vizsgálatokat. Sugár a Déli-Bakonyban, Kab-hegyen és környékén, 3 éven át havi egy-egy alkalommal vizsgálta a vadászatokon elejtett különböző korú **gímszarvasok** (*C. elaphus*) tüdőféreg-fertőzöttségét (Sugár és Kőrös, 2000). A 73 szarvasból 51-ben talált *Dictyocaulus* fertőzöttséget: prevalencia=69,9%, átlagos intenzitás=55,3 (max=984 féreg). A fertőzött állatok 58,8%-ában (30 egyedben) 20-nál kevesebb férget talált. A féregszám csupán 5 állat esetében haladta meg a 100-at, köztük volt egy 134 férget hordozó kb. 1 hónapos borjú, illetve két (984 és 264 férget hordozó) 5-6 hónapos borjú, melyek valószínűleg árvák voltak. A bélsármintából (n=27) való lárvaizolálás eredményeként 66,7%-os *Dictyocaulus* fertőzöttséget talált. Tapasztalatai szerint a szarvasoknál egy éves kor körül az átlagos féregszám lényegesen lecsökken. Ez valószínűleg a tavaszi/nyár eleji

kedvező táplálékviszonyok következtében megnövekvő, illetve korral járó általános és specifikus ellenálló-képességnek a következménye. A déldunántúli vadon élő szarvasokban (Sugár, 1997) átlagosan 46,6%-os fertőzöttséget talált (n=58). Borjak prevalenciája volt a legmagasabb (75%, n=16), míg bikákban (36,4%, n=22) és tehenekben (35%, n=20) alacsonyabb. A *Dictyocaulus* fertőzés abundanciája, a gazdánkénti féregszám változó a különböző kor- és ivarcsoportokban. A gím borjak tüdejében 3-106 db féreg (átlag 21,6), bikákban 5-55 tüdőféreg (átlag 24,3), míg a tehenekben jóval kevesebb, 3-16 volt a férgek száma (átlag 5,4). Farmon tartott gímek ürülékvizsgálata során 80%-os nagy tüdőféreg fertőzöttséget állapított meg Sugár (1994).

Vadon élő gímszarvasokban masszív tüdőféreg fertőzöttséget nem talált, ilyet csak vadaskerti és szarvastelepi természetellenes szituációban tapasztalt (Sugár, 1990, 1995). Így például egy pár hónappal korábban bekerített vadaskertbe került, korábban szabadon élő bikákban fordult elő masszív nagy tüdőféreg fertőzöttség. Vadaskertekben elhullott bikák boncolásakor a légcső és a hörgők üregét csaknem teljesen kitöltötték a férgek (2000-3000 féreg/állat). Szarvastelepi elhullott borjakban 3500-8000 féreg/állat egyedszám is előfordult. A különböző méretű férgek véres-habos nyálkába voltak ágyazva. A vadaskerti bikák fertőződését elősegíthette az ún. „kerítés-stressz” és a téli kondícióromlás. A szarvastelepi borjaknál az elválasztás és a hirtelen környezetváltozás voltak a hajlamosító tényezők, ehhez társult a *Dictyocaulus* lárvákkal való alapimmunitás hiánya, mivel a legelőre történő telepítés előtt féregmentes környezetben nevelték azokat.

A magyarországi őzekben (*C. capreolus*) előforduló tüdőféreggel ugyancsak a fent említett szerző foglalkozott (Sugár, 1995, 1997). A *Dictyocaulus* fertőzöttséget nem találta gyakorinak. Erdei élőhelyen

(83%-os erdőborítottság) lőtt őzekben 8,3%, átmeneti élőhelyen (10%-os erdőborítottság) 9,6%, míg a mezei élőhelyeken (1%-os erdőborítottság) 13% volt a prevalencia. Magasabb *Dictyocaulus* fertőzöttséget csak 3-6 hónapos gidakorban talált (31,6% prevalencia). A kifejlett őzekben ritka a fertőzöttség, csak az egyéb okok miatt legyengült egyedekben, köztük az öregekben tapasztalható ismét nagyobb arányban. Masszív fertőzöttséget egyetlen őzben sem tapasztalt.

Nagy tüdőférgesek gyakoriságával ellentétben a gócos tüdőférgesség (*V. capreoli*) ritka (6,6%) volt a mezei, közepes gyakoriságú (33,6%) az átmeneti, és általános (88,9%) az erdei őzekben. A 9-15 hónapos őzek fertőződtek a leggyakrabban (61,5%), illetve a felnőtt őzekben is viszonylag magas volt a prevalencia (36,1%). Hazai őzekben a *Dictyocaulus* és *V. capreoli* fertőzöttség elterjedt volt ugyan, de kórtani jelentősége nem volt számottevő.

2.1.1.2. Külföldi irodalom

Vadon élő **gímszarvasok** (*C. elaphus*) nagy tüdőféreg fertőzöttségét Észak-Európában alacsonyabbnak találták (Svéd. 33%, Divina és mtsai, 2002; Skócia 15%, Böhm és mtsai, 2006), mint Közép-Európában, ahol a gímek többsége fertőzött volt (Német. 80,7%, Rehbein és mtsai, 2002). A gím bikák nagyobb arányban fertőződtek, mint a tehenek. A korosztályok között nem találtak szignifikáns parazitáltsági különbséget, a prevalencia évenként jelentős eltérést mutatott. Skóciai szikaszarvasokban (*Cervus nippon*) a nagy tüdőféreg prevalencia 15%-os volt (Böhm és mtsai, 2006). Az **európai őz** (*C. capreolus*) tüdőféreg (*Dictyocaulus*) fertőzöttségét Európa több országában is a hazaihoz hasonló, 10-18% közöttinek találták (Hugonnet és Cabaret, 1987; Kazlauskas és Puzauskas, 1974; Panadero és mtsai, 2001; Rehbein és

mtsai, 2000). Ez alól kivétel volt Románia, ahol 25-50% közötti fertőzöttséget tapasztaltak (Stoican és Olteanu, 1959). Az őzek élőhelyén a vegetáció összetétele, vagy a gazdaállatok állománysűrűsége és a tüdőférgesség prevalenciája, vagy abundanciája között nem találtak összefüggést, habár az erdővel borított területeken gyakoribb volt a fertőződés (Hugonnet és Cabaret, 1987). Svédországból az 1960-as években 3-4%-os prevalenciát mutattak ki az akkor 200.000-re becsült őzállományban, majd az 1990-es évek végére a kb. 1,5 millióra felszaporodott állományban az európai átlag fertőzöttséghez hasonló, 14,7%-os prevalenciát állapítottak meg Divina és mtsai (2002). Jávor-, és dámszarvasokban alacsonyabb, 10-11%-os nagy tüdőféreg fertőzöttséget állapítottak meg Divina és mtsai (2002), illetve Rehbein és mtsai (2001). **Rénszarvasban** (*Rangifer tarandus*) ugyancsak kimutatták a nagy tüdőférges előfordulását Oroszországban (Skrjabin és mtsai, 1954), Norvégiában és Kanadában (Höglund és mtsai, 2003).

A magyarországi *Elaphostrongylus cervi* fertőzöttséghez hasonlóan Skóciában is magas (82%) prevalenciát állapítottak meg gímszarvasban, amelynek a mértéke az állatok korával emelkedett. Ugyanazon vizsgálat során viszont nem találtak *E. cervi* férget szikaszarvasokban. Németországi gímszarvasok ürülékének vizsgálatakor 47%-os fertőzöttséget állapítottak meg Rehbein és mtsai (2002), illetve az állatok korával itt is nőtt az *E. cervi* fertőzöttség.

A fertőzöttségi értékek összehasonlításánál fontos figyelembe venni, hogy különböző vizsgálati módszerekkel kapták az eredményeket (ürülék lárva száma, tüdőben lárva és kifejlett férgek száma), illetve az egyes területeken élő gazdapopulációkban végzett mintavétel feltételezhetően nem volt reprezentatív az ivar és korösszetételre, mivel többnyire a

vadászatokon elejtett gazdaállat egyedeket vizsgálták, ami szelektív mintavételnek tekinthető.

2.1.2. Tüdőféreg-fertőzöttség egyéb gazdaállatokban

A jelenleg ismert *Dictyocaulus* férgek gazdaállatai rendszertanilag a párosujjú patások (*Artiodactyla*) és a lófélék (*Equidae*) közé tartoznak. *Dictyocaulus* fertőzöttséget a föld számos országából jeleztek, jelentős állategészségügyi problémát azonban főként a mérsékelt égövi országokban okoz, különösen a szarvasmarha és juh állományokban (David, 1997). Lófélékben kisebb jelentőségű.

A *Dictyocaulus* tüdőféreggel foglalkozó szakirodalmi közlések túlnyomó hányada a szarvasmarha tüdőférgével foglalkozik, így a szarvasmarha-nagy tüdőféreg kapcsolatáról van a legtöbb ismeretünk. Kotlán Sándor, Hollósi Ferenc és Kassai Tibor kutatta a magyarországi háziállatok, így a **szarvasmarha**, juh és kecske tüdőférgait. A hazai és külföldi szakirodalom egységes megítélésű annak tekintetében, hogy a dictyocaulosis kialakulását elősegíti az esős, párás nyári-őszi időjárás. A magyarországi felmérések alapján azonban a szarvasmarha dictyocaulosis járványok a párásabb középhegységi és alföldi állományokban egyaránt kialakultak. Növendékmarha állományokban gyakran okozott elhullást a nagy tüdőféreg fertőzöttség (Kassai és Holló, 1960). A világ minden területéről jelezték a dictyocaulosis előfordulását, ahol szarvasmarhát tenyésztene, intenzíven azonban csak a csapadékos nyugat és észak-európai országokban kutatták. Különösen jelentős az ökotermelésben tartott szarvasmarha-állományok esetében, mivel nem használhatnak szintetikus anthelmintikumokat. Svédországban intenzíven kutatják a dictyocaulosis járványok körülményeit, epidemiológiáját és kezelését (Divina és Höglund, 2002; Divina és mtsai, 2000, 2002; Höglund és

mtsai, 1999, 2004, 2006, 2008). A svédországi szarvasmarha öko-farmok 80%-ában előfordul a nagy tüdőféreg. Az ökotermelésű szarvasmarha telepek állatállományaiban a dictyocaulosis járvány gyakran 20%-os elhullást is okoz (Höglund és mtsai, 2006).

Figyelemre méltó Kassai (1957) felmérése, miszerint a magyarországi **juhok** mintegy 25-30%-a fertőzött nagy tüdőféreggel. Ennél magasabb, 40-50%-os *Dictyocaulus* prevalenciát állapítottak meg kecskékben a száraz éghajlatú Marokkóban (Berrag és Urquhart, 1996).

Számos eurázsiai, észak-amerikai szarvasféléből (Cervidae) közöltek *Dictyocaulus* féreg előfordulást, ami valószínűsíti, hogy a szarvasfélék általánosan elterjedt parazitái.

Tülkösszarvú (Bovidae) gazdaállatokból ugyancsak jelezték a nagy tüdőféreg előfordulását. Így észak-amerikai és európai bölényekben szintén találtak nagy tüdőféregket, melyek gyakran okoznak elhullást a nyár végi - őszi időszakban. A masszívan fertőzött bölények szívverése gyors, légzésük szapora és lázasak. E klinikai jelek azonban többnyire észrevétlenek maradnak, és csak az elhullott tetemek boncolása során derül ki a tüdőféreg jelenléte (Drozd és mtsai, 1989). A *D. arnfieldi* tüdőféregnek a szamár az elsődleges gazdája, de lóban is előfordul (Boyle és Houston, 2006). Tevékből és afrikai antilopfélékből is ismert nagy tüdőféreg, bár kevés ismeretünk van a paraziták faji elkülönüléséről, életmenetéről (Baitursinov és Berkinbaev, 1989; Gibbons és Khalil, 1988).

A *Metastrongylus* tüdőféreg gyakori parazitái a szabad-tartású házi disznónak és a vaddisznónak (*Sus scrofa*). Az ürülékkel szabadba jutó lárvák fejlődéséhez földigiliszta (*Allolobophora*, *Aporrectodea* és *Lumbricus* spp.) köztigazda szükséges, amely a házi és vaddisznók kedvelt tápláléka. A kifejlett férgek a hörgőkben, hörgőcskében élnek,

gyakran tüdőgyulladást, enyhébb esetben csökkent testsúlynövekedést, súlyosabb esetben jelentős testsúlycsökkenést okozva (Kassai és Holló, 1960).

2.2. Tüdőférgek rendszerezése

A *Dictyocaulus* nembe tartozó tüdőférgek a parazita fonálférgek (Nematoda) Strongylida rendjének Trichostrongyloidea családsorozatába tartozó Dictyocaulidae család tagjai.

2.2.1. Magasabb rendű rendszertani viszonyok

A fonálférgek törzse (Nematoda) meglehetősen diverz életmenetű fajokat foglal magába: szabadon élő bakteriofágok, rovarpatogének, növény-, gomba-, és állat-paraziták. Az idesorolt feregcsoportok, taxonok rokonsági kapcsolatai számos különböző elképzelést tükröznek, mivel a szerteágazó életmenetek ellenére külső megjelenésükben hasonlóak a fonálférgek. Így a hagyományos morfológiai rendszerezésük gyakran vitatott. A fonálférgek fosszilis leleteinek hiánya is nehezíti az evolúciós múltjuk felderítését. Molekuláris vizsgálatuk azonban értékes rokonsági kapcsolatokra derített fényt (Audebert és mtsai, 2005; Blaxter és mtsai, 1998; Chilton és mtsai, 1997). A monofiletikusnak tekintett Strongylida rend (a *Dictyocaulus* férgek ide tartoznak) az egyik legdiverzebb állat-parazita férgeket tartalmazza, melyek világszerte elterjedtek a gerincesekben, kivéve halakban. Az e rendbe tartozó férgek, jelentős humán-, és állategészségügyi relevanciájuk révén, kiemelten fontos paraziták. A harmadik stádiumú lárvák fertőzik a gerinces gazdaállatokat szájon át, vagy bőrön át vagy vérszívó vektor közvetítésével. A bőrön keresztüli fertőzési módot tekintik ősbibb formának (Anderson, 2000). A fonálférgek rendszertanával foglalkozó kutatók egységesen elfogadják, hogy a Strongylida rend férgek a szabadon élő Rhabditida férgektől

származnak (1. ábra, Durette-Desset és mtsai, 1994; Skrjabin és mtsai, 1952). Első megjelenésük vagy a késő Devon - korai Karbon időszakra tehető, amikor megjelentek az első szárazföldi gerinces gazdaállataik, a kétéltűek (Poinar, 1983), vagy a Mezozoikumban a hüllők parazitáiként. A Strongylida rend taxonómiai felosztása Anderson (1974) munkája alapján 5 családsorozatra tagolódik: Ancylostomatoidea – emlősök vékonybelében élnek; Diaphanocephaloidea – kígyók bélférgei; Strongyloidea – emlősök és madarak gyomor-bél-, légcső-, kötőszöveti férgei; Metastrongyloidea – emlősök tüdejében, keringési- vagy központi idegrendszerében élő férgek; Trichostrongyloidea – kétéltűek, hüllők, emlősök gyomor-bél-, vagy légcső férgei. Durette-Desset és Chabaud (1993) a Strongylida rendet 4 alrendre és 7 családsorozatra osztotta: 1. Ancylostomatina (Ancylostomatoidea, Diaphanocephaloidea), 2. Strongylina (Strongyloidea), 3. Metastrongylina (Metastrongyloidea), 4. Trichostrongylina (Trichostrongyloidea, Molineoidea, Heligmosomoidea).

A *Dictyocaulus* nem taxonómiai helyzete az egyik legvitatottabb probléma a Strongylida renden belül. Morfológiai és biológiai jellegei miatt átmenetet mutat a Trichostrongylina és a Metastrongylina alrendek között. Jelenleg az egyetlen nemet a Dictyocaulidae családba, a Trichostrongyloidea családsorozatba sorolják (Durette-Desset és Chabaud, 1993). A hagyományos morfológiával foglalkozó nematoda taxonómusok többsége a trichostrongylidák közé sorolja a *Dictyocaulus* tüdőférgeket (Chitwood, 1969; Skrjabin és mtsai, 1954), azonban Dougherty (1951) a metastrongylidákhoz közelebbi rokonságot feltételez a nagy tüdőférgek evolúciós hovatartozását illetően.

2.2.2. *Dictyocaulus* morfológia és taxonómia

A szarvasmarha nagy tüdőférgét már 1782-ben leírták *Gordius viviparus* fajnév alatt. A *Dictyocaulus* nemet jóval később, több mint száz évvel ezelőtt írták le azon Nematoda férgekrol melyek viszonylag nagyméretű tüdőférges és a párosujjú patások hörgőiben, hörgőcskéiben élnek (Railliet és Henry, 1907). A nem leírásakor 4 fajt soroltak ide. Skrjabin (1954) összefoglalta a *Dictyocaulus* férgesrol addig elérhető ismereteket. Munkájában a *D. noeneri* fajnevet törölte, és a korábban általa leírt *D. eckerti* fajt tekintette a szarvasfélék nagy tüdőférgének. Gibbons és Khalil (1988) a *Dictyocaulus* nemet a Trichostrongyloidea családsorozatba sorolta a morfológiai jellemzők alapján: feji vég struktúrája, nőstények szaporodó szerve, spikulum és burza alakja. Egyúttal 6 fajt fogadtak el érvényesnek. 2002-ben írtak le még egy új fajt svédországi őz és jávorszarvas nagy tüdőférgesként (Gibbons és Höglund, 2002). Így jelenleg az alábbi 7 érvényes *Dictyocaulus* fajt tartják nyilván.

Dictyocaulus viviparus (Bloch, 1782) Railliet & Henry, 1907

Eredetileg Bloch írta le 1782-ben *Gordius viviparus* fajnév alatt, majd Railliet és Henry (1907) sorolta a *Dictyocaulus* nembe. Több szinonim fajnév alatt is leírták, ami állategészségügyi jelentőségét is jelzi: *Ascaris vituli* Gmelin, 1790; *Strongylus micrurus* Mehlis, 1831; *S. vitulorum* Rudolphi, 1809.

Dictyocaulus filaria (Rudolphi, 1809) Railliet & Henry, 1907

Eredetileg Rudolphi írta le 1809-ben *Strongylus filaria* név alatt, majd Railliet és Henry (1907) a *Dictyocaulus* nem típusfajaként írta le.

Dictyocaulus arnfieldi (Cobbold, 1884) Railliet & Henry, 1907

Eredetileg Cobbold írta le 1884-ben *Strongylus arnfieldi* fajnév alatt a ló nagy tüdőférgesként, majd Railliet és Henry (1907) sorolta a *Dictyocaulus* nembe.

***Dictyocaulus eckerti* Skrjabin, 1931**

Eredetileg Nyugat-Szibériából írták le, mint a rénszarvas (*Rangifer tarandus*) nagy tüdőférgét (Skrjabin, 1931). Majd egy Németországból származó dámban talált *Dictyocaulus*-t nevezték ezen a néven (Epe és mtsai, 1997). A faj morfológiai azonosítása, gazdaállatköre meglehetősen vitatott.

***Dictyocaulus cameli* Boev, 1951**

Angliai állatkertben élő kétpúpú teve (*Camelus bactrianus*) nagy tüdőféreg fajaként írta le Gibbons és Khalil (1988), illetve dromedárból (*Camelus dromedarius*) is jelezték előfordulását (Priadko és Baitursinov, 1984).

***Dictyocaulus africanus* Gibbons & Khalil, 1988**

Tehénantilop (*Alcelaphus buselaphus*) és lantszarvúantilop (*Damaliscus korrigum*) gazdaállatokat közölt Kenyából és Szudánból a faj leírásakor Gibbons és Khalil (1988).

***Dictyocaulus capreolus* Gibbons & Höglund, 2002**

Svédországi *Dictyocaulus* férgek molekuláris fajazonosítási kutatása során derült fény arra, hogy az őzek és részben jávorszarvasok nagy tüdőférgerei egy addig nem ismert *Dictyocaulus* fajba tartoznak (Höglund és mtsai, 1999). A genetikai vizsgálatokkal elkülönített fajt Gibbons és Höglund (2002) írta le.

A fentiekben felsorolt nagy tüdőféreg neveken kívül leírtak még egyéb *Dictyocaulus* fajokat is, de ezek a nevek csak szórványosan fordulnak elő. E fajnevek valószínűleg a már ismert *Dictyocaulus* fajok szinonim nevei vagy a leírásuk elégtelen a többi fajtól való megkülönböztetéshez, így jelenleg érvénytelenek (Durette-Desset és Chabaud, 1993; Gibbons és Khalil, 1988; Gibbons és Höglund, 2002, Jansen és Borgsteede, 1990).

A *Dictyocaulus noeneri* Raillet & Henry, 1907 fajt Durette-Desset és mtsai, (1988) újra leírták franciaországi őzből. Javasolták az európai vadon élő szarvasok nagy tüdőférgének neveként használni, illetve a Skrjabin (1931) által leírt *D. eckerti* fajnevet a korábban leírt *D. noeneri* fajnév szinonimjaként érvényteleníteni. Korábban Skrjabin (1954) a *D. noeneri* fajnevet alkalmazhatatlan névnek találta, mivel a fajleírás hiányos volt. A *D. noeneri* morfológiai leírása nem elegendő más fajoktól való elkülönítéshez, azaz „species inquirenda” (Jansen és Borgsteede, 1990). Sem pontos gyűjtőhelyet, sem típuspéldányt nem jelöltek ki a szerzők. Ezért a fajnevet később ismét alkalmazhatatlannak tekintették, „incertae sedis” (Gibbons és Höglund, 2002; Carreno és mtsai, 2009). Bár már 1954-ben és 1990-ben is bizonytalan eredetű fajnévnek nyilvánították – leírása alapján nem lehet tudni, hogy mely nagy tüdőférgekre vonatkozik – még későbbi publikációkban is használták e nevet, minden egyéb azonosítási karakter közlése nélkül (Panadero, 2001).

Dicytocalus hadweni Chapin, 1925 - amerikai bölényből és jávorszarvasból jelezték előfordulását.

Dictyocaulus murmanensis Poljanskaja & Tschertkowa, 1964 - rénszarvasból írták le.

Dictyocaulus pandionis Sobolev & Sudikarov, 1939 - ázsiai vadszamárból írták le.

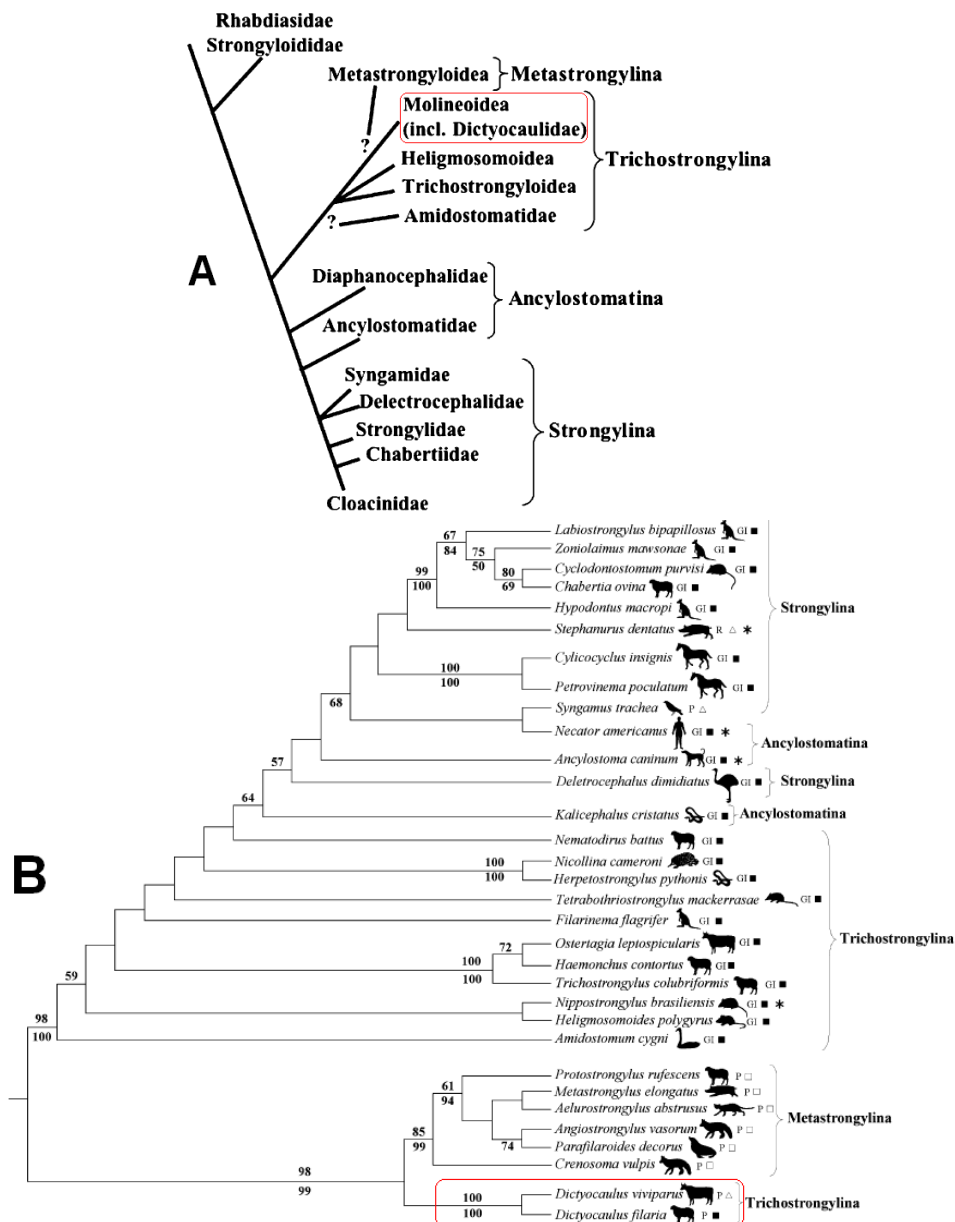
Dictyocaulus sibiricus Orloff, 1934 - háziállatokból írták le.

Dictyocaulus unequalis Bhalearo, 1932 - háziállatokból írták le.

2.2.3. Molekuláris filogenetika

Blaxter és mtsai (1998) filogenetikai felosztása szerint a Nematoda törzs 5 kládra osztható a 18S riboszomális RNS gén DNS (18S rDNS)

szekvenciáinak elemzése alapján. A Strongylida rend monofiletikusnak bizonyult több független elemzés alapján (Blaxter és mtsai, 1988; Bellocq és mtsai, 2001; Chilton és mtsai, 2006). A Strongylida rend 28S riboszomális RNS gén (28S rDNS) szekvencia alapú molekuláris filogenetikája szerint (Bellocq és mtsai, 2001) a *Dictyocaulus* nem meglehetősen kilóg a Trichostrongyloidea családsorozatból. Annyira, hogy e szekvenciák illesztési problémái miatt inkább kihagyták a *Dictyocaulus*-okat a Strongylida rend analíziséből. Höglund és mtsai (2003) a 18S rDNS szekvenciáit elemezték a *Dictyocaulus* nem fajaira, illetve egyéb Trichostrongyloidea fajokra. Arra a következtetésre jutottak, hogy a Dictyocaulidae család nem a Trichostrongyloidea családsorozatba tartozik, hanem inkább a Strongyloidea-ba. A Strongylida rend számos fajának a 18S és 28S rDNS szekvencia elemzése (Chilton és mtsai, 2006) egyértelműen bizonyította, hogy a *Dictyocaulus* tüdőférgék nem a trichostrongylidákkal, hanem a metastrongylidákkal állnak szoros rokonsági kapcsolatban. Az elemzés szerint a *Dictyocaulus* fajcsoport egy testvérága a metastrongylidáknak (1. ábra). A *Dictyocaulus* evolúciós vonal levált a többi tüdőben élősködő metastrongylidától. A Strongylida fonálférgeken belül a *Dictyocaulus*-Metastrongylida evolúciós csoport egyértelműen elkülönül a többi féregtől (Trichostrongylina, Strongylina, Ancylostomatina alrendek). A DNS vizsgálatok alapján a két eltérő evolúciós vonal összhangban van a gazdaállat csoportok és szöveti/szervi előfordulás (lokalizáció) szerinti tagolódásával.



1. ábra. A Strongylida renden belül a főbb taxonómiai csoportok feltételezett evolúciós kapcsolatai (A) Durette-Desset és mtsai (1994) szerint, illetve (B) kombinált 18S és 28S riboszomális RNS gének szekvenciáiból felállított filogenetikai fa Chilton és mtsai (2006) munkája alapján. A filogenetikai ágak felett az 50%-nál nagyobb bootstrap értékek a maximum parszimónia, míg az ágak alatt a neighbour joining analízisekre vonatkoznak.

A *Dictyocaulus*-Metastrongylina evolúciós vonal férgei emlős gazdaállatok légző-, keringési-, és a központi idegrendszer szerveiben

parazitálnak (Anderson, 2000), míg az egyéb Strongylida férgek a gyomor-bél rendszerben élnek kétéltűekben, hüllőkben, madarakban, emlősökben, illetve a belső szervek körüli kötőszövetekben, emlős gazdáiban. Az idetartozó légzőszervekben élősködő férgek (*Syngamus* és *Cyathosoma* fajok) többsége madarakban, a *Mammomonogamus* fajok emlősökben (patkányban, macskában, Cuadrado és mtsai, 1980) és emberben élnek (Nosanchuk és mtsai, 1995). Így az emlősök légzőszerveiben élősködő Strongylida férgek két különböző evolúciós vonalat képviselnek, egyik a *Dictyocaulus*-*Metastrongylina* vonal, a másik a syngamidák, melyek másodlagosan térhettek át a tüdőben való élősködésre.

2.2.4. *Dictyocaulus* fajokra vonatkozó molekuláris rendszertani kutatások
Amióta felállították a *Dictyocaulus* nemet, azóta vannak problémák az ide tartozó fajok elkülönítésével (Durette-Desset és Chabaud, 1993; Gibbons és Khalil, 1988; Jansen és Borgsteede, 1990; Skrjabin és mtsai, 1954). Különösen ellentmondásos a szarvasfélékben élő fajok azonosítása. *Dictyocaulus* fajoknak a morfológiai identifikálása erősen behatárolt. Kevés karakter látható rajtuk, és jelenleg nem ismeretes kétséget kizáró fajelkülönítő bélyegük (Divina és mtsai, 2000). A feji végen levő bukkális kapszula falvastagságát használják egyes kutatók a *Dictyocaulus* fajok morfológiai elkülönítéséhez (Durette-Desset és mtsai, 1988; Jansen és Borgsteede, 1990), azonban e karakterek átfedő mérettartományokat mutatnak nagyszámú minta értékelésekor (Divina és mtsai, 2000).

A morfológiailag nehezen vagy nem elkülöníthető fajok esetében alternatív megoldást jelenthetnek a DNS alapú technikák, azaz megfelelő genetikai lókuszt jelentheti a fajelkülönítő tulajdonságot. Előző tanulmányokból kiderült, hogy az „internal transcribed spacer 2 (ITS2)

régió, mely a sejtmagi 5,8S és 28S rDNS régiók között található, megfelelő genetikai marker a tüdőférgek fajspecifikus azonosításához és genetikai jellemzéséhez. Különböző PCR alapú technikákat alkalmaztak a nagy tüdőfereg fajok elkülönítéséhez (McKeand, 1998; Gasser, 1999): DNS szekvenálást (Gasser és mtsai, 1993; Epe és mtsai, 1997), restrikciós fragmentumhossz polimorfizmust (RFLP) (Citillas és mtsai, 1995; Schnieder és mtsai, 1996; Conole és mtsai, 1999), továbbá polimeráz láncreakcióval kapcsolt immunológiai kimutatást (Polmerase Chain Reaction - Enzyme Linked Immunosorbent Assay, PCR-ELISA) (Divina és mtsai, 2000, 2002; McKeand, 2000), polimorfikus DNS véletlenszer sokszorosítást (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) (Epe és mtsai, 1995), egyszálú DNS konformáció polimorfizmust (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP) (Gasser, 1997; Gasser és Chilton, 2001), illetve fajspecifikus primerek alkalmazását (Samson-Himmelstjerna és mtsai, 1997). A közölt molekuláris módszerek többsége nem igazán tükrözi a fajokra jellemző DNS szekvencia polimorfizmust, vagy túlságosan drága és időigényes ahhoz, hogy nagyszámú mintát vizsgálhassunk vele.

Az eddig közölt cikkek nem konzekvensen alkalmazták ugyanazon lókuszt a *Dictyocaulus* férgek genetikai jellemzésre. A különböző földrajzi régiókból/országokból származó tüdőférgek csak részben, vagy nem voltak összevethetőek, mivel más-más genetikai lókuszt elemeztek (Hu és mtsai, 2002; Höglund és mtsai, 2006, 2008; Carreno és mtsai, 2009).

A nagy tüdőfereg ITS2 PCR-hez használt primereket a *Chaenorhabditis elegans* DNS szekvenciák primereinek (Gasser és mtsai, 1993) kisebb módosításával *D.viviparus*-ra tervezték Höglund és mtsai (1999). Két végén konzervatív régiót tartalmaz, melyek 3' végén az 5,8S rRNS, illetve

5' végen a 28S rRNS génhelyhez kapcsolódnak. A *Dictyocaulus* fajok közt meglehetősen variábilis genetikai markernek adódott az ITS2 régió (Epe és mtsai, 1997; Höglund és mtsai, 2003). A 18S rDNS szekvenciáit használták a fonalférgek magasabb szintű evolúciós kapcsolatainak becslésére (Blaxter és mtsai, 1998). Konzervatív régió lévén kis különbségek vannak közelrokon fonalféreg fajok közt a 18S rDNS szekvenciák közt. Carreno és mtsai (2009) közöltek nagy tüdőférgekre primereket a 18S rDNA régió PCR-es felszaporításához. A 28S rDNS-t ugyancsak számos filogenetikai tanulmányban használták. *Dictyocaulus* tüdőférgek esetében csak Carreno és mtsai (2009) vizsgálták e hosszú régió egyes szakaszait. A 28S rDNS 5' végi D2-D3 régióra jelentős genetikai változékonyságot találtak spanyolországi szarvasfélék tüdőférgeinek vizsgálata során. A szerzők a 28S rDNS 3' végi kb. 900 bp hosszú szakaszának DNS szekvenciáit is közölték, azonban e régióra teljesen azonos szekvenciákat kaptak különböző *Dictyocaulus* fajokból. Höglund és mtsai (2008) a Major Sperm Protein 1 génjét (MSP1) vizsgálták potenciális vakcina és a dictyocaulosis detektálása céljából. Munkájukban az MSP1 gén szekvenciák fajon belül nem, viszont fajok között mutattak különbségeket.

A svédországi *D. viviparus* populációgenetikai vizsgálatokban több mitokondriális gén szekvenciáit is vizsgálták (Hu és mtsai, 2002; Höglund és mtsai, 2006). E génhelyek közül a citokróm c oxidáz 1 alegység gén (cox1) bizonyult a legkonzervatívabb mitokondriális génnek, mely jól mutatta a *D. viviparus* populációs különbségeit (Hu és mtsai, 2002). A cox1 gén DNS szekvenciáját széleskörben használják az állati élővilág feltérképezésének genetikai lókuszaként, ún. univerzális “barcoding” markerként (www.qbol.org). A *D. viviparus* populációgenetikai vizsgálataiban nem a “barcoding” fragmentumot,

hanem azzal szomszédos a *cox1* 3' végi felének DNS szekvenciáit elemezték.

A *D. eckerti* és *D. viviparus* tüdőférgek biológiai faji megkülönböztetésében megoszlottak a vélemények. Nem csupán taxonómiai kérdésről van szó, hanem gyakorlati jelentősége is van a különböző gazdaállatok közti keresztfertőzések lehetősége miatt. Svédországi szarvasmarhából (*D. viviparus*) és új-zélandi gímszarvasból (*D. eckerti*) származó tüdőférgek mitokondriális genomjának teljes szekvenálását közölték Gasser és mtsai (2012). A két mitokondriális genom DNS szekvenciájának jelentős különbözősége jelzi, hogy valóban 2 különböző fajról van szó. A szerzők javasolták a *Dictyocaulus* fajok, populációk elkülönítéséhez a mitokondriális genomban található fehérje kódoló gének (12 gén) szekvenciáinak meghatározását, ami egyértelműen jellemezné az adott *Dictyocaulus* genotípust. Höglund és mtsai (2003) dámszarvasból egy külön fajba sorolandó tüdőférget mutattak ki ITS2 DNS szekvencia alapján. Egyelőre még leíratlan fajnak tekinthető.

A *Dictyocaulus* fajok rokonsági kapcsolataira is végeztek vizsgálatokat. A *D. arnfieldi* fajból csupán egyetlen ITS2 rDNS szekvencia áll rendelkezésre, e DNS régió viszont nem igazán alkalmas a *Dictyocaulus* fajok rokonsági viszonyainak becslésére. A *D. filaria* elkülönült a többi vizsgált nagy tüdőféreg fajoktól, melyek egy közel rokon fajcsoportot alkotnak (*D. capreolus*, *D. eckerti*, *D. viviparus*). A fajcsoporton belüli rokonsági kapcsolatokra vonatkozóan nem kaptak megbízható választ a 18S és ITS2 rDNS szekvenciák elemzésével sem (Höglund és mtsai, 2003).

2.3. Dictyocaulus férgek gazda-fajlagossága

2.3.1. Morfológiai fajazonosítással alátámasztott gazda-parazita kapcsolatok

A *Dictyocaulus* férgekkel kapcsolatos szakirodalmi közlések egyik fő kérdése, hogy mely gazdaállat fajban mely nagy tüdőféreg faj jelenléte igazolható, illetve milyen parazitológiai mutatókkal (prevalencia, abundancia, intenzitás). Igen változatos gazda-parazita képet kapunk, ha a tüdőféreg fajok gazdaállat körét vesszük alaposan szemügyre a hazai és nemzetközi publikációk áttekintésével. A következőkben az egyes *Dictyocaulus* fajok gazdaállatkörét összesítettem a szakirodalmi adatok alapján. A magyarországról származó nagy tüdőféreg gazdaállatairól szóló publikációkat vastag betűvel emeltem ki.

Dictyocaulus viviparus

- szarvasmarha (*Bos taurus*) (Sprehn, 1932; **Kassai és Holló, 1960, 1962**; Durette-Desset és mtsai, 1988; **Kassai, 1989, 1999**; Gibbons és Khalil, 1988; Bienioschek és mtsai, 1996; Divina és mtsai, 2000; Höglund és mtsai, 2003)
- őz (*C. capreolus*) (Nilsson, 1971; **Kutzer és mtsai, 1987**; Eckert és mtsai, 1992; **Sugár, 1994**)
- jávorszarvas (*A. alces*) (Pybus, 1990)
- rénszarvas (*R. tarandus*) (Kummeneje, 1977)
- dām (*D. dama*) (Guildal, 1962)
- gím (*C. elaphus*) (**Sugár és Sárközi, 1988; Sugár, 1990, 1994**; Eckert és mtsai, 1992;)
- európai bölény (*Bison bonasus*) (Drozd és mtsai, 1989)
- zerge (*R. rupicapra*) (Stefancikova, 1999)
- impala (*Aepyceros melampus*) (Boomker és mtsai, 1989)

- vörös bóbitásantilop (*Cephalophus natalensis*) (Boomker és mtsai, 1991)
- szikaszarvas (*Cervus nippon*) (Mason, 1994)
- sörényes szarvas (*Rusa timorensis*)
(<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/database>)
- zambézi víziantilop (*Kobus leche*) (Stafford, 1991)
- öszvérszarvas (*Odocoileus hemionus*) (Pybus, 1990)
- fehérfarkú szarvas (*Odocoileus virginianus*) (Pybus, 1990)
- pézsmatulok (*Ovibos moschatus*)
(<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/database>)
- argali juh (*Ovis ammon*) (<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/database>)
- muflon (*Ovis aries*) (Ruziev, 2001)
- kanadai vadjuh (*Ovis canadensis*)
(<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/database>)
- nagy nádiantilop (*Redunca arundinum*) (Boomker és mtsai, 1989)
- pusztai bóbitásantilop (*Sylvicapra grimmia*)
(<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/database>)
- nyala (*Tragelaphus angasi*) (Boomker és mtsai, 1991)
- nagy kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) (Jooste, 1990)

Dictyocaulus filaria

- juh (*Ovis aries*) (Sprehn, 1932; **Kassai, 1958; Kassai és Holló, 1963; Kassai és mtsai, 1974;** Gibbons és Khalil, 1988; Kassai, 1999; Alemu és mtsai, 2006)
- kecske (*Capra hircus*) (Sprehn, 1932; **Kassai és mtsai, 1974;** Berrag és Urquhart, 1996, **Kassai, 1999)**
- muflon (*O. musimon*) (Panayotova-Pencheva és mtsai, 2005)
- zerge (*Rupicapra rupicapra*) (Hörning és Wandeler, 1968)
- szarvasmarha (*B. taurus*) (Sprehn, 1932)
- gímszarvas (*C. elaphus*) (Sprehn, 1932)
- dámszarvas (*D. dama*) (Sprehn, 1932)
- észak-amerikai bölény (*Bison bison*) (<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/database>)
- vízibivaly (*Bubalus bubalis*) (<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/database>)
- argali juh (*Ovis ammon*) (<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/database>)
- urial (*Ovis vignei*) (<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/database>)

Dictyocaulus arnfieldi

- szamár (*Equus asinus*) (Sprehn, 1932; Matthe és mtsai, 2002; Boyle és Houston, 2006)
- ló (*Equus caballus*) (Sprehn, 1932; Boyle és Houston, 2006)

- ázsiai vadszamár (*Equus hemionus*)
(<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/database>)

Dictyocaulus eckerti

- gímszarvas (*C. elaphus*) (Gibbons és Khalil, 1988; **Sugár és Kőrös, 2000**; Johnson és mtsai, 2003; Panayotova-Pencheva és mtsai, 2005)
- jávorszarvas (*A. alces*) (Divina és mtsai, 2000)
- rénszarvas (*R. tarandus*) (Skrjabin, 1954)
- őz (*C. capreolus*) (Borgsteede és mtsai, 1990; Rehbein és mtsai, 2000)
- dám (*D. dama*) (Gibbons és Khalil, 1988)
- szikaszarvas (*Cervus nippon*) (Gibbons és Khalil, 1988)
- szarvasmarha (*B. taurus*) (Bienioschek és mtsai, 1996)
- disznószarvas (*Axis porcinus*) (állatkert, India, Gibbons és Khalil, 1988)
- indiai muntyákszarvas (*Muntiacus muntjak*) (Vietnám, Phan és mtsai, 1984)

Dictyocaulus africanus

- tehénantilop (*Alcelaphus buselaphus*) (Kenya, Gibbons és Khalil, 1988)
- lantszarvúantilop (*Damaliscus korrigum*) (Szudán, Gibbons és Khalil, 1988)

Dictyocaulus cameli

- kétpúpú teve (*Camelus bactrianus*) (állatkert, Anglia, Gibbons és Khalil, 1988)
- dromedár (*Camelus dromedarius*) (Kazahsztán, Priadko és Baitursinov, 1984)

Az alábbi gazdaállatokból jeleztek nagy tüdőféreg előfordulást fajnév megjelölése nélkül (*Dictyocaulus* sp., <http://www.nhm.ac.uk>):

- csíkos gnú (*Connochaetes taurinus*)
- közönséges lantszarvúantilop (*Damaliscus lunatus*)
- láma (*Lama* sp.)
- vörös nyársasszarvas (*Mazama americana rufa*)
- fehér farkú szarvas (*Odocoileus virginianus*)
- nagy kudu (*Tragelaphus strepsiceros*)

A fenti gazdafaj lista alapján általános következtetésként megállapíthatjuk, hogy a nagy tüdőférgeseket számos párosujjú patás fajból (*Artiodactyla*) és néhány lóféle emlősből (*Equidae*) kimutattak. Egyes *Dictyocaulus* fajok (*D. eckerti*, *D. filaria*, *D. viviparus*) diverz irodalmi gazdaköréből azt feltételezhetjük, hogy vagy (1) valóban széles gazdaspektrummal rendelkeznek, vagy (2) gyakran hibás a publikált gazda-parazita kapcsolat. A *Dictyocaulus* fajokkal kapcsolatos irodalmi közlések többségében megjegyzik, hogy a tüdőféreg fajok morfológiai elkülönítése problémás. Ezt figyelembe véve kétséges, hogy minden esetben valósak-e az irodalmi publikációkban közölt gazda-parazita kapcsolatok.

2.3.2. Fertőzési kísérletek

Gazdasági vonatkozásai miatt, a szarvasmarhák nagy tüdőférgességét tanulmányozták a legbehatóbban. A szarvasmarhák dictyocaulosis fertőzési hullámai véletlenszerűen jelentkeznek, kiszámíthatatlanok. Egyik lehetséges okának vélték, hogy a vadon élő szarvasoktól származik a fertőződés. Különösen ott lehet jelentős a keresztfertőződés, ahol közös legelőt használnak a haszon- és vadon élő kérődző állatok. Több tanulmány is foglalkozott azzal a lehetőséggel, hogy a vadon élő

szarvasfélék vajon rezervoárai-e a szarvasmarhákban is élő tüdőférgeknek. Gyakorlati jelentősége miatt számos átviteli kísérletet végeztek a kérdés megválaszolásához, és egymásnak ellentmondó eredményeket is közöltek. Őz tüdőférégevel sikeresen fertőztek szarvasmarhákat (Hildebrandt, 1962), illetve a szarvasmarha tüdőférégevel mesterségesen fertőzték az őzeket (Kutzer, 1988). Németországban kísérleti körülmények közt sikerült dából tüdőférgeket átvinni szarvasmarha borjakba, és fordítva is (Bienioschek, 1996). Eszerint a jelenleg elkülönített fajok életképesek különböző gazdaállatokban is. A lárvairítás mértéke azonban szignifikánsan különbözött a két gazdafajban. A szarvasmarha tüdőférégevel fertőzött szarvasmarhák és dák nagy mennyiségű lárvát ürítettek, tehát mindkét gazdafajban szaporodott. Viszont a dából származó tüdőférgel fertőzött szarvasmarhák lárvairítése elhanyagolható volt. Eszerint a dák tüdőférége a szarvasmarha nem megfelelő gazdája, ez a faj vélhetően szarvasokhoz adaptálódott. Egyes kutatók feltételezték, hogy a szarvasmarhában élő *D. viviparus* faj szinonim a szarvasfélék tüdőférégevel (*D. eckerti*). Juhból származó *D. filaria* (Enigk és Hildebrandt, 1965), és gímszarvasból származó nagy tüdőférgel (Corrigal és mtsai, 1988) való beoltással sikeresen fertőztek szarvasmarhákat. Számos szakember gondolta a dictyocaulosis terjesztőinek, rezervoároknak a vadon élő szarvasféléket, de ezt egyértelműen egyetlen vizsgálat sem támasztotta alá.

Svédországban is végeztek tüdőférgel átviteli kísérleteket. Őz tüdőféréget vitték át szarvasmarhába, de szarvasmarhában nem tudtak kifejlődni a kísérletileg bevitt lárvák. Eszerint az őz nagy tüdőférgel szarvasmarhában nem okozott fertőzést. Viszont a szarvasmarhában immunitás alakult ki a saját *D. viviparus* tüdőférégevel szemben, ami a

fajidegen vakcinázási lehetőségekre irányítja a figyelmet (Divina és Höglund, 2002).

2.3.3. Molekuláris vizsgálatokkal alátámasztott gazda-parazita kapcsolatok

A hazai és nemzetközi szakirodalom alapján a *Dictyocaulus* tüdőféreg és gazdaállataik közt igen bonyolultnak tűnik a gazda-parazita viszony definiálása. Ehhez a zavaros képhez bizonyára jelentősen hozzájárul, hogy a morfológiailag hasonló féreg fajokat nehezen, vagy nem lehet kétséget kizáróan elkülöníteni. Ezért feltételezhető, hogy a téves fajok közlése okozza a bonyolultnak tűnő gazda-parazita kapcsolatokat. A DNS alapú vizsgálatokkal azonosított *Dictyocaulus* fajokat is tartalmazó publikációk alapján már jóval tisztább kép rajzolódik ki a nagy tüdőféreg gazda-fajlagosságát illetően. A molekuláris vizsgálatokkal alátámasztott gazda-parazita kapcsolatokat az alábbi lista mutatja a bizonyító hivatkozásokkal. Az aláhúzott gazdaállatok olyan gazda-parazita kapcsolatot jeleznek, melyeket kizárólag molekuláris vizsgálatok tártak fel.

Dictyocaulus viviparus

- szarvasmarha, Németország (Epe és mtsai, 1997), Svédország (Höglund és mtsai, 1999, 2003; Divina és mtsai, 2000), Új-Zéland (Johnson és mtsai, 2004; Gasser és mtsai, 2012)

Dictyocaulus filaria

- juh, Ausztrália, Németország (Epe és mtsai, 1997; Höglund és mtsai, 2003; Johnson és mtsai, 2004)

Dictyocaulus eckerti

- gímszarvas, Spanyolország, Svédország, Új-Zéland (Carreno és mtsai, 2009, Höglund és mtsai, 2003; Johnson és mtsai, 2004)
- dák, Németország (Epe és mtsai, 1997)

- rénszarvas, Norvégia (Divina és mtsai, 2002; Höglund és mtsai, 2003)
- jávorszarvas, Svédország (Divina és mtsai, 2000, 2002; Höglund és mtsai, 2003)
- pézsmatulok, Alaszka (*Ovibos moschatus*) (Höglund és mtsai, 2003)

Dictyocaulus capreolus

- európai őz: Svédország (Gibbons és Höglund, 2002; Höglund és mtsai, 2003), Spanyolország (Carreno és mtsai, 2009)
- jávorszarvas: Svédország (Gibbons és Höglund, 2002; Höglund és mtsai, 2003)
- zerge: Spanyolország (Carreno és mtsai, 2009)

Dictyocaulus arnfieldi

- szamár, Németország (Epe és mtsai, 1997)

Dictyocaulus sp.

- dám, Svédország (Höglund és mtsai, 2003)

A fenti gazda-parazita kapcsolatokról kitűnik, hogy a *D. viviparus* rendes gazdája a szarvasmarha, a *D. filaria* rendes gazdája a juh, a *D. arnfieldi*-nek pedig a szamár. A *D. eckerti* szélesebb gazdakörrel rendelkezik, mint a többi *Dictyocaulus* faj. Így él a szarvasféléken (Cervidae) kívül a tülkösszarvú gazdaállatokban is (Bovidae). *D. capreolus* rendes gazdája az európai őz, és részben a jávorszarvas. Höglund és mtsai (2003) 8 emlősfajból származó *Dictyocaulus* féreg DNS szekvenciáit elemezték (18S rDNS és ITS2). Egy németországi damban élő tüdőféregből olyan nukleotid sorrendeket kaptak, melyek valószínűleg egy addig ismeretlen *Dictyocaulus* fajt képviselnek. Formális fajleírást nem adtak e tüdőféregről.

A magyarországi szarvasfélékből (dámszarvas, gímszarvas és őz) a *D. viviparus*, *D. filaria* és *D. eckerti* tüdőféreg fajokat közöltek (lásd 2.3.1. fejezet). E fajok azonosítása morfológiai illetve gazdaállat alapján történt.

2.4. Tüdő férgek életciklusa

A nagy tüdő férgek közül a szarvasmarhában élő *Dictyocaulus viviparus*-t tanulmányozták a legrészletesebben. Jelenlegi ismereteink szerint a szarvasfélék tüdőférgének is hasonló életmenete lehet. A szarvasmarhában élő kifejlett *D. viviparus* férgek többnyire a hörgőkben és légcsőben élnek. A nőtények már teljesen embrionált tojásokat raknak, melyekből szinte azonnal kibújnak az első stádiumú lárvák (L1). A kis lárvákat felköhögi a gazdaállat, majd lenyeli őket. A bélcsatornán végigjutva kerülnek ki a külső környezetbe az ürülékkel. Tehát a frissen hullatott bélsárban található L1 lárvák jelenléte mutatja a tüdőféreg fertőzést. A még nem fertőzőképes lárvák nem táplálkoznak, a harmadik lárvastádiumig (L3) az ürülékkupacban maradnak. A tojásból való kibújáskor elegendő szikanyagot tartalmaznak, hogy elérjék a harmadik lárvastádiumot. Hasonlóan más Trichostrongyloidea lárvákhoz a fertőzőképes lárvák kevésbé mozgékonyak. Különös módszer alakult ki az evolúció folyamán annak érdekében, hogy a szabadba kijutott lárvák az ürülékkupacból szétterjedjenek a környező növényekre, ahonnan a legelő gazdaállatok táplálkozás során felvehetik őket. Jorgensen (2002) szerint a lárvák felmásznak a trágyakupacokon közönségesen előforduló *Pilobolus* gombák sporangiumára. Mások szerint a lárvák csak véletlen mozgás során kerülhetnek e sporangiumokra, vagy berágják magukat a gombába (Somers, 1985). A kifejlődött sporangiumok a sporangiumtartó megnövekedett turgornyomásától ellökődnek, hogy a spórákat szétszórják a környező területekre, így a tüdőféreg lárvákat szintén szétrepítik

(Gronvold és Jorgensen, 1987). Ezáltal a trágyakupac körül 1-3 m sugarú körben terjedhetnek szét a lárvák. A szabadba került lárváknak nemcsak segítői (*Polibolus* penészgombák), hanem ellenségei is vannak (Sugár és mtsai, 2006). A kérődzők élősködő férgeinek természetes ellenségei, populációik szabályozói, a trágyakupacokat feltúró bogarak, valamint azoknak és a trágyalegyeknek a lárvái (Bergstrom és mtsai, 1976). A ganéjtúró bogarak a trágyakupacok átjárásával parazita férgek tojásait, lárváit pusztítják (Fincher, 1973). Észak-amerikai jávorszarvasok ürülékkupacaiban az *Aphodius* bogaraknak van jelentős szerepük a *Dictyocaulus* lárvák pusztításában (Bergstrom, 1983). Májustól októberig az ürülékkel szabadba jutott lárvák nagy részét elfogyasztják, így a fiatal borjak ősziig kevésbé fertőződnek tüdőféreggel.

A legelő gazdaállat a füvekkel együtt elfogyasztja az L3, fertőzőképes lárvákat is. A *Dictyocaulus* férgek poszttembrionális fejlődésének 2. szakasza a gazdaszervezetben való vándorlás. A fertőzés után a parazita L3 lárvái a vékonybél falába furakodnak, és a nyirokárammal jutnak a bélfodri nyirokcsomókba. A fertőzés utáni 2-5. napon a nyirokcsomókban megtörténik a 3. vedlés, ezáltal szexuálisan differenciált negyedik stádiumú lárvákká (L4) fejlődnek. Az L4 lárvák fertőzés utáni kb. 10. napon jutnak a tüdőbe. A tüdőféreg életmenetével foglalkozó szerzők többsége szerint az L4 lárvák a bélfodri nyirokcsomókból a nyirok és véráram útján jutnak el a tüdőig, a mellvezetéken át. Kassai és mtsai (1972) juhokkal végzett kísérleteiben kimutatta, hogy a fertőző *D. filaria* lárvák többsége nem a mellvezetéken át vándorol a tüdőig, mivel a mellvezeték mûtéti úton átvágta. Ezért alternatívaként említi a májon át, a portális rendszer közvetítésével való vándorlást. Az L4 lárvák a fertőzés utáni kb. 30. napon érik el a tüdőt, átfúrják magukat a tüdő-kapillárisok falán, és az alveolusokba kerülnek. Itt történik az utolsó vedlés, majd a

kifejlett tüdőférgesek felmásznak a hörgőcskébe, hörgőkbe. Kifejlett féreggé 3-5 hét alatt válnak a tojásokból kikelő lárvák. A tüdőbe került lárvák azonban késleltetett fejlődéssel akár fél évig hipobiotikus állapotban szunnyadhatnak (Anderson, 2000). A gazdaállatban a hipobiotikus állapotban (L5) telelhetnek át a tüdőférgesek, mint a következő évi féreg generáció forrásai.

A szamárbán, lóban élő *D. arnfieldi* lárvákat tartalmazó tojásokból csak az ürülékkel szabadba kikerülés után bújnak ki az L1 lárvák. A *D. arnfieldi* L1 lárvái kifejlett féreggé 12 hét alatt válnak (Kassai, 1999).

Az első éves fiatal gazdaállatok vannak leginkább kitéve a tüdőféreg fertőzéseknek, mivel nekik még nincs korábbi fertőzéssel kialakult specifikus immunválaszuk (Hoskin és mtsai, 2000). Különösen nyár végén és ősszel fertőződnek gyakran a borjak. A dictyocaulosis fertőzés főként Észak, és Nyugat-Európában elterjedt és gyakori, ahol enyhe és csapadékos a nyár. Észak-Amerikában ritkábban jelzik előfordulásukat, mivel a tüdőférgesek által okozott tüdőgyulladást gyakran vírusos vagy baktériumos eredetűnek vélik. Enyhébb telű területeken az L3 lárvák áttelelhetnek, illetve a felnőtt gazdaállatokban telelnek át hipobiotikus lárvaként a tüdőben. Tehát ezek jelentik a rezervoárt. A gazdaállaton kívül áttelelt lárvák számát Európában csak Angliában és Belgiumban találták magasnak, másutt (Dánia, Ausztria, Svájc) alacsony volt (Ploeger, 2002). Megfigyelték, hogy a száraz, meleg időben a fertőzőképes lárvák a talajba vonulnak, mert ott hűvösebb, párásabb a környezet, majd alkalmas esős, párás időjáráskor ismét a felszínre másznak. A *Dictyocaulus*-ok életképességét bizonyítja, hogy L3 lárvákat folyékony nitrogénben tárolva 15 év múlva is még találtak fertőzőképes nagy tüdőférgeseket (Wyk és mtsai, 2000).

Magyarországi vizsgálatokból (is) kimutatták, hogy kecskében a *D. filaria* nemcsak erősebben patogén, hanem hamarabb válik ivaréretté (kecskében az első lárvák leghamarabb a 29., juhban a 31. napon jelennek meg a bélsárban), és több lárvát termel, mint juhban (Kassai és mtsai, 1974). A kecske tehát fogékonyabb, mint a juh a *D. filaria* okozta fertőzésre. Ebből következik, hogy a kecskék valószínűleg fontos rezervoár szerepet játszanak a juhok fertőzési forrásainak a létrehozásában azokon a területeken, ahol a juhokat és kecskéket együtt, vagy egy területen legeltetik.

2.5. Tüdőférgesség kórtana

A *Dictyocaulus* lárvák szárazsággal szemben érzékenyek, életben maradásukhoz elsősorban nedvességre van szükség. A csapadékos klímájú területeken, a levegő magas relatív páratartalma miatt, a dictyocaulosis gyakori lehet a legeltetett állatállományokban. A késői és pontatlan diagnózis gyakran oka a dictyocaulosis okozta veszteségeknek. A nagy tüdőférgesség okozta veszteségek megelőzése szempontjából fontos, hogy az állatok gondozója idejében észrevegye az első, néhány állaton jelentkező légzőszervi tüneteket: szapora, nehéz légzés köhögéssel, vagy nélküle. A dictyocaulosis súlyosbodásával az állatok gyors kondícióromlása következik be. A tünetek okozóját azonban nem könnyű azonosítani. A tünetek alapján a bántalom rendszerint nem különíthető el az egyéb (vírusos, bakteriális) eredetű tüdőmegbetegedésektől. A dictyocaulosis járvány idején a tüdőbeli kóros folyamatok különböző kombinációi jelentkezhetnek: alveolitis, bronchiolitis, bronchitis, tüdőödéma, emphysema, bronchopneumonia. Gyakran súlyos kórtani elváltozásokat okoznak az alveolusokon és hörgőcskék falán áthatoló lárvák és a kifejlett férgek. A fertőződés

kezdeti stádiumában gyulladásos válaszreakció alakul ki. Az interleukin-1 és interleukin-6 citokinek stimulálják a hepatocitákat akut fázis proteinek termelésére. Ezek a proteinek különféle gyulladásos folyamatokban vesznek részt, baktériumokhoz kötődnek, szövet gyógyulási folyamatokban és immunválasz szabályzásban. A gyulladásos válaszreakció során a vérben egyes proteinek mennyisége megnő, ami specifikus lehet az adott betegségre. Szarvasmarhában a tüdőférgesség okozta gyulladásos válaszreakcióban a heptaglobin, szérum amiloid A és a fibrinogén koncentrációja megnő. E proteinek koncentrációja vírusos és bakteriális eredetű tüdőbetegség során is hasonlóképpen magas. Ha azonban magas koncentrációban mérhető az eozinofil granulocitákkal együtt, az specifikus a tüdőférgek okozta bántalomra (Gänheim és mtsai, 2004). A hörgőcskék légútjait eldugíthatja a gyulladásos válaszreakció során odajutó eozinofil és neutrofil granulocitákat, makrofágokat tartalmazó váladék. Ha elég sok sejt gyűlik össze, annyira eldugíthatják a levegő útját, hogy a sejtgyülemtől disztálisan eső alveolusok összeesnek, mert a bennük rekedt levegő abszorbeálódik a vérbe, a friss levegő pedig nem jut át az eozinofil dugón. A tüdőférgek számának növekedésével egyre több ilyen lézió alakul ki, ami súlyos esetben tüdőödémához, majd a gazdaállat elhullásához vezethet. Enyhébb fertőzés esetén, a néhány adult féreg a gazdaszervezet erős immunválaszával kikerülhet a tüdőből. Közepes fertőzés esetén több hónapig is eltarthat a kigyógyulás, ráadásul másodlagos baktériumos tüdőgyulladás is kialakulhat. A fertőzöttség idején az alveolusok epitéliuma proliferálódik, ennek következtében a vékony egyrétegű permeabilis epitélium réteg helyett vastagabb, többsoros hámréteg alakul ki. Ez kevésbé átjárható az oxigén és széndioxid számára, ami légzési nehézségeket okoz.

A bélsárvizsgálatból kimutatható *Dictyocaulus* lárvák és az elhullott/kényszervágott állatok tüdejének boncolásakor előkerült tüdőférgek igazolják a diagnózist. Növendékmарhák légzőszervi tüneteinek megjelenésekor, és az egy-két héttel későbbi bélsárvizsgálat során csak kevés állatból tudták kimutatni a *Dictyocaulus* lárvákat (Kassai és Holló, 1962). Amikor a koprológiai vizsgálatot néhány héttel később megismételték, már sok lárvát tudtak kimutatni. Következésképpen az első tünetek megjelenése körüli időben még csak az előző évből visszamaradt, vagy május-június hónapokban szerzett primer fertőzésekből származó kevés féreg vált ivaréretté. Az általuk produkált petékből, a külvilágra kerülő lárvák, kedvező helyi körülmények alatt, létrehozták a tömeges fertőzési forrást. Az elhullott állatok boncolásakor (post-mortem) a tüdő másod-, és harmadrendű hörgőcskéiben tartózkodnak elsődlegesen a *Dictyocaulus* férgek. A *D. viviparus* L4 és L5 lárváinak tömeges jelenléte is súlyos megbetegedést, elhullásokat okozhat szarvasmarhákban (Kassai és Holló, 1960, 1962). A dictyocaulosis járványok elején a kifejlett nagy tüdőférgek kis egyedszáma vagy hiánya észlelhető, néhány héttel később már tömeges lehet. A bélsár lárvatartalmából az állategyed fertőzöttségének fokára nem lehet megbízható következtetést levonni. Adott állatcsoport 10-nél több egyedének átlagos bélsár lárvaszáma már megbízható tájékoztatást ad a fertőzöttség intenzitásáról. Valószínűleg amiatt, hogy az erős egyedi mérések szórásai már kiegyenlítik egymást. Ilyen csoport-vizsgálatok esetében a lárvaszám és féregszám arány megközelítően 1:1.

Több szerző egybehangzó véleménye szerint, a *Dictyocaulus* férgekkel szemben erős immunválasszal reagál a gazdaszervezet. Immunis gazdáknál a *Dictyocaulus* lárvák már az első két szöveti gáton, bélfalban és nyirokcsomókban fennakadhatnak, vagy lelassul a fejlődésük. Az

immunis gazdába behatoló lárvák valószínűleg már a gazdaszervezetben való vándorlás során jelentősen károsodhatnak. A *Dictyocaulus* lárvák egy része immunis gazdáknak is eljuthat a tüdőbe, ahol gyakran elpusztul vagy retardálódik (Kassai és mtsai, 1972).

2.6. Védekezési lehetőségek a dictyocaulosis ellen

A világ számos országában, így Magyarországon is általában kemoterápiás kezelésekkel védekeznek a parazita féregfertőzések ellen. Sugár és Kőrös (2000) megítélése szerint, az ezernél kisebb tüdőféreg-számnak még szopós korban sincs számottevő káros hatása a vadon élő szarvasokban. Így a nagy tüdőférget a gímszarvas rendes, apatogén parazitájának tekinthetjük. Vadaskertekben, szarvasfarmokon azonban a normálistól eltérő körülmények közt súlyos dictyocaulosis alakulhat ki. A dictyocaulosis ellen való gyógyszeres védekezés csak intenzív körülmények között válhat szükségessé. A benzimidazolok közé tartozó albendazol, és az avermektinek közé tartozó moxidectin és ivermectin tartalmú készítményekkel való kezelések jó hatékonyságúak a tüdőférgek ellen (Sugár és Sárközy, 1988; Sugár, 1995; Kassai, 1999).

A közvetlen fejlődésű *Dictyocaulus* lárvák a tél folyamán rendszerint elpusztulnak a legelőn. A féreghordozó gazdaállatok által tavasszal ürített L1 lárvákból 4-7 nap alatt kifejlődhetnek a fertőző L3 lárvák, azonban a masszív fertőződés alapjául szolgáló fertőzési források csak július-augusztus-szeptember hónapokban alakulnak ki. Ezek létrehozásában rendszerint fontos szerep jut egyrészt az idősebb állatokban levő hipobiotikus lárvák tavaszi, és ellés körüli aktiválódásából eredő fokozott lárvaurítésnek, másrészt az elsőéves borjakban kialakuló féreg populációnak. A hűvös, száraz tavasz csökkenti, a meleg csapadékos időjárás növeli a fertőző lárvák egyedszámát a legelőn. A preventív célú

anthelmintikus kezelések optimális időpontja, a másodéves vagy idősebb szarvasmarhák esetében a kihajtást vagy ellést megelőző időszak, és a fertőződés csúcsideje (június vége – július eleje). Szarvasmarha dictyocaulosis megelőzési/kezelési ajánlatot Kassai (1989) dolgozott ki magyarországi viszonyokra anthelmintikumok használatával: (1) első kezelés anthelmintikummal kihajtás (ellés) előtt, (2) második kezelés anthelmintikummal június végén - július elején, (3) legelőváltás a második kezelés után 2-3 nappal. Korábban a hígított Lugol-oldatnak a légcsőbe fecskendezését is alkalmazták kezelésre (Kassai és Holló, 1960), vagy féregölő szereket (pl. *Chenopodium*-olaj) speciális gépi berendezés segítségével igen apró részecskékké oszlattak szét, és a kezelendő állatokat a fejükre tett maszkon át 10-15 percig lélegeztették (aeroszol-terápia).

A dictyocaulosis egyike a leggyakoribb parazitás bántalmaknak juhokban és kecskékben Magyarországon is (Kassai, 1957; Kassai és mtsai, 1974). 1961-ben az akkori jugoszláv szakemberek kidolgoztak egy röntgenbesugárzással attenuált, élő, fertőző stádiumú (L3) *Dictyocaulus filaria* lárvákat tartalmazó oltóanyagot ("Difil") a juhok tüdőférgességgel szembeni aktív immunizálására (a szarvasmarha-tüdőférgesség elleni brit "Dictol"-vakcina mintájára). Magyarországi juhokban és kecskékben kipróbálták a "Difil" vakcinát provokált fertőzés kezelésére, de nem bizonyult hatékonynak a tüdőférgesség ellen (Kassai és mtsai, 1974). Kassai (2003) a juhok tüdőféreg-ellenes preventív, anthelmintikumokkal való féregtelenítést tartja célszerű módszernek. Magyarországon május-június hónapokban kell alkalmazni. Tetramizollal végzett megelőző féregtelenítést javasol gyakorlati alkalmazásra. Magyar kutatók több anthelmintikumot is teszteltek szarvasmarha és juh tüdőférgesség kezelésére. A dietilkarbamazin-citrát tartalmú "Loxuran" hatékony

gyógyszerként használható a juh dictyocaulosisának orvoslására, viszont a gócos tüdőférgességet okozó protostrongylidákkal szemben hatástalan (Kassai és Holló, 1963). A ditrazinfoszfát (1-dietilkarbamil-4-metilpiperazin-foszfát) hatékony gyógyszernek bizonyult juhokban a *D. filaria* és a gócos tüdőférgek ellen is (Kassai, 1958). A *D. filaria*-val erősen fertőzött juhok teljes féregmentessége csak háromszori ditrazin kezeléssel volt elérhető.

A szarvasmarhák, juhok nyári féregtelenítési kezeléseit célszerű összekapcsolni a gulyának, nyájnak nem fertőzött legelőre való áthajtásával, a kezeléseket után 2-3 nap elteltével. A legelőváltás elegendő lehet a fertőzöttség létrejöttének megelőzéséhez, féregtelenítő kezelések nélkül is. A széles hatásspektrumú albendazol hatékony számos parazita féreg ellen, az ivermektin a férgek kivül az ektoparazita ízeltlábúakat is elpusztítja.

Az anthelmintikumok használata széles körben elterjedt a világon, különösen amióta a széles hatásspektrumú féreghajtó szereket bevezették. Az anthelmintikumok használatának egyik lényeges hátránya a rezisztencia kialakulása, elterjedése. Az anthelmintikummal szembeni rezisztencia öröklődő jelleg, mely a parazita populáción belüli szelektálódásnak az eredménye. Azokban az országokban (Ausztrália, Brazília, Új-Zéland, USA), ahol évtizedeken át, évente többször vagy akár havonta anthelmintikummal történő kezelést alkalmaztak, a korábban jól bevált szerek később elvesztették hatékonyságukat (Molento, 2009). A rezisztens férgek kisselektálódását befolyásolja az anthelmintikumok hatásmechanizmusa, alkalmazásának gyakorisága, különböző szerek rotációja, legeltetési módszerek, rezisztenciát okozó gén(ek) genetikai jellemzője (recesszív/domináns), férgek generációs ideje, utódszám, populációméret és rezisztencia-mutációk gyakorisága. Elsősorban

juhokban jelentek meg anthelmintikumokkal szemben rezisztens férgek, ahol a juhokat azonos legelőn tartották, emellett ugyanazon szerrel, vagy azonos hatású szerekkel, gyakran kezelték. Az anthelmintikumokkal való kezelés után másik legelőre áthajtott gazdaállatokban, illetve az új legelőn csak a kezelést túlélő, rezisztens férgek válnak további fertőződés forrásává, ami elősegíti a rezisztens férgek elterjedését, a rezisztencia területi terjedését.

A szarvasmarha borjak nagyrészt anthelmintikus kezelést kapnak a féregfertőzések ellen. Az anthelmintikumok azonban erősen csökkentik a tüdőféreg elleni specifikus immunválasz kifejlődését. A kezelt másod és harmadéves szarvasmarhák súlygyarapodásukban elmaradnak a nem kezelt, hasonló lárvafertőzöttséget kapott állatoktól (Larsson és mtsai, 2011). A szintetikus kemikáliák immunrendszerre kifejtett negatív mechanizmusa nem igazán ismert. Az anthelmintikumokkal kezelt állatok húzában levő szermaradékok miatt a fogyasztók egyre inkább a szermaradványoktól mentes élelmiszereket helyezik előtérbe.

Az anthelmintikumok másik hátránya, hogy szinte az összes széles spektrumú anthelmintikummal szemben már rezisztens férgek jelentek meg, terjedtek el. Így a régebben jól bevált szerek mára kevésbé vagy hatástalanok lettek a rezisztens férgek ellen (Jabbar és mtsai, 2006; Molento, 2009). Ugyancsak az ilyen kezelés ellen szól, hogy az állat ürülékével a legelőre került trágyakupacban jelentős mennyiségű kemikália ürül, ami elpusztítja a trágyával szabadba jutó féreglárvák természetes ellenségeit, így a különböző ganéjtúró bogarakat és a trágyalegyek lárváit.

A parazita férgek elleni vakcinák előállításán több kutatócsoport is dolgozott (Ellis és mtsai, 2003; McKeand, 2000, Molento, 2009; Ploeger, 2002). A vakcinajelöltek közül csupán néhány vált hatékonyá, köztük a

sugárzással gyengített lárvákat tartalmazó vakcinák a *D. viviparus* és *D. filaria* elleni védekezésben. Európában már 1950-es évektől alkalmaztak szarvasmarhákban tüdőféreg elleni vakcinát, 1965-től pedig a jól bevált Dictol-t. A vakcina besugárzással legyengített L3 lárvákat tartalmaz (Johnson és mtsai, 2003). Két hónapos kortól adják a borjaknak szájon át, két alkalommal. A két kezelés közt legalább 4 hétnek kell eltelnie. Az 1970-es, 80-as évektől egyre szélesebb körben alkalmaztak féregtelenítő készítményeket, melyek hosszabb ideig hatnak és szélesebb spektrumúak. Akkor azt gondolták, hogy hamarosan a múlté lesz a dictyocaulosis az állattenyésztő farmokon. Azonban az 1990-es évektől egyre nagyobb mértékű dictyocaulosis járványok alakultak ki a szarvasmarha farmokon, elsősorban Nyugat-Európában (Ploeger, 2002). A besugárzott lárvákkal való vakcinázásnak több hátránya is van. Nem alakul ki a szarvasmarhákban élethosszig tartó immunitás természetes fertőződés hiányában. A vakcina instabil, ezért külföldre való szállítása problémás, évente kell újrakészíteni, ami fertőzött gazdaállatok fenntartását igényli. A 1990-es évektől számos tudományos munkát közöltek stabil élethosszig tartó rekombináns vakcina kifejlesztéséről (McKeand, 2000; Ploeger, 2002; Strube és mtsai, 2015). Elsősorban Nagy-Britanniában foglalkozott több kutatócsoport a kifejlett férgek által szekretált enzimekkel. Az immunmodulációs hatásának tekintett acetilkolin-észteráz enzimmel, mint egy lehetséges vakcina jelölttel jó eredményeket értek el kísérleti tengeri malacokban, de szarvasmarha borjakban nem adott szignifikáns védettséget. Más szekretált enzimekkel (proteináz, szuperoxid-dizmutáz) azóta is folynak kísérletek. A szarvasmarha tüdőféreg elleni vakcinát új-zélandi gímszarvasokban is kipróbálták, de hatástalan volt (Johnson és mtsai, 2003). Következésképpen a *D. viviparus* sugárzással gyengített L3

lárvák elleni immunizálás hatástalan a gímszarvasok *D. eckerti* tüdőférgével szemben.

Genomszekvenálási technológiát is alkalmaztak a hatékony rekombináns vakcinák előállítására céljából a szarvasmarha tüdőférgével szemben. A *D. viviparus* különböző fejlődési stádiumú és ivarú példányokból teljes transzkriptom analízist is végeztek, mely során az L3 lárvára mintegy 7000, nőstényre 5200 és hímre 7900 specifikus nukleotid szekvenciát (mRNS) határoztak meg Cantacessi és mtsai (2010). Az elemzésük során három vakcina jelölt gént is megjelöltek, melyek a *Caenorhabditis elegans* homológ génjeivel összehasonlítva, a letális RNS interferenciában résztvevő gének.

Szerológiai diagnosztikai ELISA tesztekkel dolgoztak ki Hollandiában, Németországban pedig gyorsvizsgálatot vérmintára a dictyocaulosis kimutatására, ugyanis a lárvaujrités koprológiai vizsgálatával viszonylag későn mutatható ki a fertőzés. A szarvasmarha nagy tüdőférges a fertőződés után 1-2 hónappal ürít utódlárvákat. Az ELISA teszt hátránya, hogy csak 4-5 héttel a fertőződés után mutat pozitív eredményt, és a férgek kiürülése után is néhány hónap eltelik, amíg negatív lesz a teszt eredménye (McKeand, 2000). A szarvasmarhák dictyocaulosis betegségének klinikai tünetei a köhögés, gyors légzés és a lázas állapot. A jelenlegi ELISA tesztek a kifejlett tüdőféreg jelenlétét mutatja ki. Azonban a hirtelen, tömeges lárvafertőzés is súlyos betegséget okozhat, amikor még nincs kifejlett tüdőféreg a gazdaállatban. Így célszerű lenne, ha a fertőzőképes L3 lárvák antigénre fejlesztenének kimutatási tesztet, mely a korai fertőzést jelezné. A tünetek és a legeltetési viszonyok valószínűsíthetik a tüdőférgességet az állattartók számára. Szarvasok esetében nincs ilyen egyértelmű tünet, csak ritkán köhögnek a fertőzött állatok. A dictyocaulosis-sal érintett állatállományokban a betegség tünetei

egyedenként nagymértékben változó lehet, azaz a tüdőférgességgel szembeni ellenálló képesség az adott gazdaegyed fiziológiai állapotától függ. Másrészt olyan tüdőféreg vonalat is kimutattak, mely folyamatosan jelen volt az adott szarvasmarha telepen évek óta, de sohasem okozott dictyocaulosis megbetegedést, ami a *Dictyocaulus* férgek patogenitási változékonyságát bizonyítja, melynek vélhetően genetikai háttere van (Ploeger, 2002). Egyes szarvasmarha borjakban a kezdeti lárvafertőzés után az E immunglobulin (IgE) mennyisége drasztikusan megnőtt, míg más borjakban alig változott (Kooyman és mtsai, 2002).

Néhány parazita gombát már kipróbáltak biológiai védekezési ágensként a legelőkön levő parazita fonálférgek lárvái ellen, de még nem elég hatékonyak (Larsen, 1999).

A hagyományos állattartásban korábban bizonyos növényeket etettek a férgekkel fertőzött állatokkal. A magas tannin tartalmú növények gyakran hatásosak a parazitafertőzések leküzdésében (Hoste és mtsai, 2006; Iqbal és mtsai, 2005, 2006a, 2006b). Bizonyos növénykivonatok alkalmazása egy lehetséges út lehet a dictyocaulosis megelőzésében, gyógyításában.

2.7. Tüdő férgek populációgenetikája

A parazita fonálférgek széles körben elterjedtek az életközösségekben. Sok növény és állatfajnak van egy vagy több parazita fonálférge. A parazitafertőzések (kolonizációk) epidemiológiájának megismeréséhez nagy segítséget nyújtanak a populációgenetikai megközelítési módszerek. A populációgenetikai vizsgálatok segítik a faji határok megállapítását, a gazdaszervezethez kapcsolódó specializációk, gyakran bonyolult életmenetek, hibridizációs események, szaporodási módok, beltenyésztettség, kolonizációs történet és populációdinamika megismerését (Gilabert és Wasmuth, 2013). Ezek a tényezők határozzák

meg a valós populációk strukturálódását, elhatárolását, amit megismerni igyekszünk. A parazita férgek populációgenetikai elemzésének egyik gyakorlati jelentősége a gyógyszer-rezisztencia elterjedésének követése. A parazita férgekben tapasztalt anthelmintikumokkal szembeni rezisztencia mára széles körben elterjedt és súlyos humán-, állategészségügyi-, és gazdasági probléma (Molento, 2009).

Price (1980) szerint a parazitákra általánosítva jellemző a helyi beltenyésztett populáció, és jelentős genetikai különbség van a földrajzi és/vagy gazdák által elkülönült populációk között. A fonálférgek populációgenetikai struktúrájának megismeréséhez korábban izoenzim, RFLP, PCR alapú eljárásokat, DNS szekvenálást alkalmaztak (Blouin és mtsai, 1991; Gilabert és Wasmuth, 2013).

A mitokondriális DNS szekvenciák különösen alkalmasak fajok közötti és fajon belüli genetikai változékonyság tanulmányozására, mivel a fonálférgekben kiugróan nagy a mutációs ráta, és a rekombináció kismértékű az anyai öröklődésű mitokondriális genomban (Blouin 1998, 2002; Zhu és mtsai, 2000). A fonálférgekben mintegy tízszer nagyobb mutációs rátát tapasztaltak egyéb állatcsoportok rátájához viszonyítva (Blouin 1998), ezért a mitokondriális gének nukleotid sorrendje kimondottan alkalmas populációgenetikai vizsgálatokhoz (populáció struktúra, populációk közti génáramlás becslésre). Továbbá a mitokondriális genomban a fehérje kódoló géneknek magasabb a mutációs rátája, mint a riboszomális géneké (Höglund és mtsai, 2006; Gasser és mtsai, 2012). A *cox1* gén szekvenciákat gyakran használják populációgenetikai elemzésekhez, mivel elegendően magas a mutációs rátája, univerzális primerek és rengeteg *cox1* DNS szekvencia áll rendelkezésre korábbi tanulmányokból, ami a közelrokon taxonok populációinak struktúrájával és genetikai diverzitásával való

összehasonlítást lehetővé teszi. A *cox1* szekvenciákat számos parazita fonálféreg (*Ancylostoma caninum*, *D. viviparus*, *Necator americanus*) populációgenetikai vizsgálatában alkalmazták (Blouin, 2002; Hawdon és mtsai, 2001; Hu és mtsai, 2002, Miranda és mtsai, 2008).

Populációgenetikai vizsgálatot *Dictyocaulus* tüdőférgessel csak svédországi szarvasmarha-állományoknál végeztek, különböző molekuláris módszerekkel (Hu és mtsai, 2002; Höglund és mtsai, 2004, 2006, 2008). Svédországban a szarvasmarha farmok 40%-a, az organikus farmok 80%-a fertőzött valamilyen mértékben nagy tüdőférgessel (Höglund és mtsai, 2006). Az ökotermelés elterjedése miatt az anthelmintikumok használatát nélkülöző szarvasmarhatartás egyik fő problémája a dictyocaulosis kezelés.

Svédországi szarvasmarhatelepekről begyűjtött nagy tüdőférgek genetikai összetételét AFLP módszerrel és variábilis mitokondriális gének DNS szekvenálásával elemezték (Hu és mtsai, 2002; Höglund és mtsai, 2006). Egy-egy telepről 8-10 *Dictyocaulus* féreg példányt vontak vizsgálatba, genetikai összetételük reprezentált egy-egy populációt. Az AFLP és variábilis mitokondriális gének szekvencia elemzése hasonló eredményt adtak. A szarvasmarha farmokon specifikus *Dictyocaulus* populációk alakultak ki. Két különböző DNS szekvenálási munka is hasonló eredményre vezetett. A mitokondriális *cox1* gén (Hu és mtsai, 2002), és 4 egyéb mitokondriális gén (*cox3*, *nad4*, *rrnL*, *trna*, Höglund és mtsai, 2006) alapján kapott eredmény szerint 12, illetve 16 haplotípust lehetett elkülöníteni. E haplotípusok közül néhány együtt, vagy csak egy-egy található az adott farmon. A farmok közötti *Dictyocaulus* populációk között a génáramlás alacsony, erősen srukturált populációszerkezet alakult ki. A farmok között a szarvasmarhák cseréje gyakori, azonban a farmra újonnan bekerülő állatok karantén antiparazitikus kezelése

hatékony. A strukturált populációszerkezetből következően ritkán jut be egy farmra új genotípusú tüdőféreg. A svédországi szarvasmarhák tüdőférgének fragmentált populációszerkezete a növényekben és rovarokban élősködő fonálférgekéhez hasonló. A *Dictyocaulus* férgekkel közelebbi rokonságban álló Trichostrongylidae családba tartozó gyomor-bélférgek populációszerkezete viszont kevésbé strukturált, nagyfokú génáramlást bizonyít (Blouin és mtsai, 1995; Archie és Ezenwa, 2011). A svédországi szarvasmarha farmok vizsgálata is bizonyítja, hogy komoly gazdasági jelentősége van a dictyocaulosis járványok epidemiológiájának megismerése, a paraziták minél részletesebb életútjának tanulmányozásának, hogy megfelelő védekezési módszerek álljanak rendelkezésre.

3. A DISSZERTÁCIÓ CÉLKITŰZÉSEI

A disszertáció célkitűzései a következők voltak:

1.) a hazai szarvasfélék, így a gímszarvas (*Cervus elaphus*), a dámszarvas (*Dama dama*) és az európai őz (*Capreolus capreolus*) tündőféreg fajainak azonosítása DNS vizsgálati módszerekkel, illetve az elkülönített tündőférgek genetikai távolsága alapján, a feltehetően biológiai fajok megállapítása;

2.) saját DNS szekvencia eredményeimet összevetve a korábban közölt adatokkal, a *Dictyocaulus* nemen belüli filogenetikai rokonsági viszonyok elemzése;

3.) a genetikailag elkülönített tündőféreg fajok azonosítására gyors, olcsó, gyakorlatban is használható PCR alapú fajelkülönítő módszerek kipróbálása, leírása;

4.) a hazai szarvasfélék tündőférgének fajsztű gazda-parazita kapcsolatainak megállapítása, nemzetközi adatokkal való összevetése, ezáltal a *Dictyocaulus* fajok gazda-fajlagosságának leírása;

5.) a hazai szarvasfélékben előforduló tündőférgek populációgenetikai vizsgálata, a gazdaegyed, gazdafaj, lokális és nagyobb tájegység szerinti féreg állományok genetikai diverzitásának leírása, a populációk elkülönültségének elemzése, illetve a populációk közti génáramlások, múltbeli populációdinamika becslése.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

A célkitűzések szerinti vizsgálati módszerek logikai sorrendje az alábbi:

1. Vizsgálatokat végeztem annak kiderítésére, hogy a Magyarországon élő szarvasfélékben élő nagy tüdőférgek vajon mely *Dictyocaulus* faj(ok)hoz tartozhatnak. Mivel morfológiai bélyegek alapján nincs szélesebb körben elfogadott fajhatározó kulcs e tüdőférgekre, ezért sejtmagi és mitokondriális DNS szekvencia alapú vizsgálatokat alkalmaztam. E genetikai markerek alapján jellemeztem a hazai szarvasokban élő nagy tüdőférgeket. A hazai szarvasfélékből származó számos tüdőféreg több genetikai lókuszának DNS szekvenciáit határoztam meg, melyek a Nematoda fajok/populációkra variábilisek. A szekvenciákat csoportosítottam genetikai hasonlóságuk alapján. A DNS szekvencia csoportokat molekuláris taxonómiai egységeknek tekintettem (molecular operational taxonomic unit: MOTU). DNS szekvenciákat csoportosító elemzésekben a taxonómiai egységek (MOTU-k) meghatározása különbözőképpen adható meg. Véleményem szerint az egyik jó megközelítés lényege, hogy ha az egyes csoportokon belüli nukleotid eltérések legnagyobb értéke is kisebb, mint a csoportok közötti szekvencia különbségek legkisebb értéke, akkor a molekuláris taxonómiai egységek elkülönítése egyértelmű. Minél nagyobb e két érték közti tartomány (MOTU-gap), annál biztosabbak lehetünk, hogy a biológiai fajoknak megfelelően definiáljuk taxonómiai egységeinket. A MOTU egységeket párosítottam a már leírt *Dictyocaulus* fajokkal (GenBank-ból elérhető DNS szekvencia hasonlóságok alapján), mint hagyományos taxonómiai

egységekkel. Az egyes hazai *Dictyocaulus* fajok (MOTU egységek) néhány kiválasztott példányából további genetikai lókuszokra határoztam meg a DNS szekvenciákat. Olyan lókuszokat szekvenáltam, melyeket más külföldi *Dictyocaulus* férgek genetikai jellemzésére már korábban használtak, így a hazai *Dictyocaulus* fajokat részletesen össze tudtam hasonlítani az eddig közölt más országokból származó tüdőférgek DNS szekvenciáival. A fenti módszer alapján határoztam meg a hazai tüdőféreg példányok faji hovatartozását.

2. Munkám során a hazai *Dictyocaulus* fajok 5 különböző genetikai lókuszának DNS szekvenciája alapján össze tudtam hasonlítani az eddig publikált *Dictyocaulus* fajok DNS szekvenciáit. Az 5 gén/lókusz nukleotid polimorfizmusa alapján a *Dictyocaulus* fajok leszármazási, evolúciós rokonsági viszonyainak becslését is elvégeztem.
3. A már ismert hazai *Dictyocaulus* fajok reprezentatív mintáit felhasználva, kerestem olyan PCR alapú eljárást, ami megbízható fajazonosító módszerként használható a kétséges morfológiai identifikálással szemben.
4. Munkám egyik lényeges kérdésére, a *Dictyocaulus* fajok gazda-fajlagosságára is a molekuláris módszerekkel faji szinten azonosított tüdőféreg példányok alapján következtettem.
5. A *cox1* szekvenciák polimorfizmusa lehetővé tette a hazai szarvasfélék nagy tüdőférgének populációgenetikai elemzését, mivel populációs szinten is variábilis lókusznak bizonyult. A tüdőférgek *cox1* szekvencia polimorfizmusából következtettem a populációgenetikai struktúrájára a természetben létező férgek szaporodási egységeinek méretére, múltbeli populáció nagyság

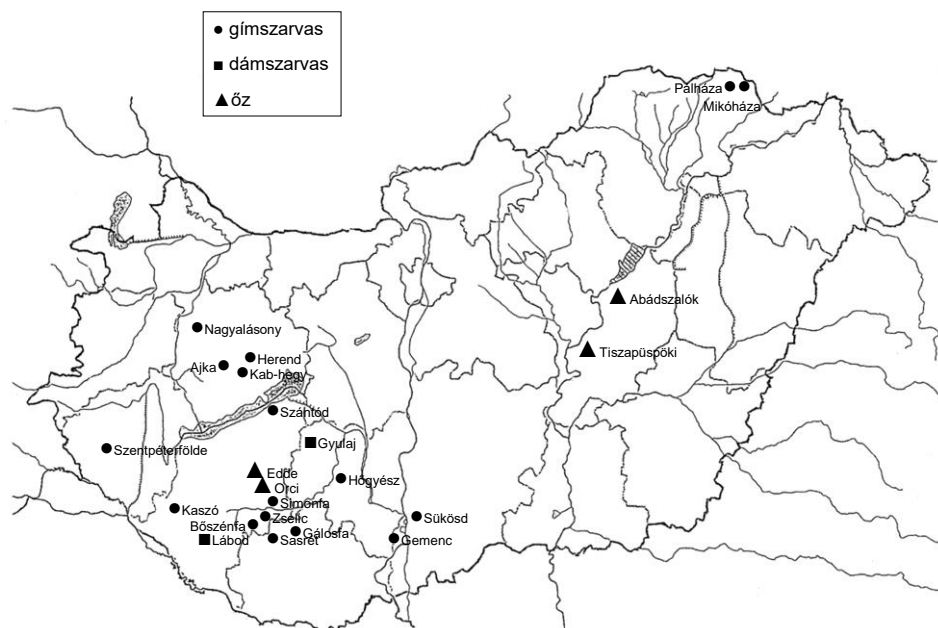
változásra, területi elterjedésére, génáramlásra, populációk genetikai diverzitására és evolúciós potenciáljára.

4.1. Hazai szarvasfélékben élő tüdőférgesek faji azonosítása

4.1.1. A vizsgálati anyag begyűjtése

Mivel munkám célja elsősorban a hazai szarvasfélékben élő *Dictyocaulus* férgek diverzitásának megismerése volt, ezért a genetikai vizsgálatba vont férgek kiválasztásánál az alábbi szempontokat vettem figyelembe, fontossági sorrendben: (1) Vadon élő szarvasfélék minden fajából legyen tüdőféreg minta (őz, gím, dóm). (2) Magyarország minél több régiójából gyűjtsünk mintákat (utazási lehetőségeinkhez mérten). (3) A gazdaállatok mindkét-ivarú egyedéből, és (4) különböző korosztályokból származó férgeket gyűjtsünk. Külcsoportként olyan féregfajok genetikai vizsgálatát is elvégeztem, melyek a *Dictyocaulus* fajokkal való evolúciós közeli rokonságát szakirodalmi adatok alapján feltételezhetjük, és egyben a szarvasfélék vagy más hazai nagyvadakban szintén tüdőben élőködnnek. E szempontok alapján a *Dictyocaulus* férgekkel közeli rokonságban álló *Metastrongylus*, *Elaphostrongylus* és *Setaria* férgeket is vizsgáltam. A *Metastrongylus* tüdőférgeseket a vadászatokon lőtt vaddisznók tüdejéből gyűjtöttem. Vaddisznók tüdejében gyakran több száz tüdőféreg egyed is előfordul, melyek közül morfológiai alapon választottam ki a genetikai vizsgálatba vont példányokat. Külcsoportként a hazai szarvasokban élő *Elaphostrongylus cervi* és *Setaria cervi* férgeket is vizsgáltam. E férgek életciklusuk, vándorlásuk során előfordulnak a tüdőben, így a szarvasfélék tüdejében előforduló férgek diverzitásának vizsgálatába beletartoznak. Kifejlett (adult) nagy tüdőférgeseket a vadászatokon lőtt szarvasok tüdejében, elsősorban a kisebb hörgőkben, ritkábban főhörgőkben és/vagy a légcsőben (tracheában) találtunk (Melléklet 1-2.

kép). Magyarország 23 pontjáról származtak a fereg minták, illetve egy helyről az erdélyi Kászonból (Keleti-Kárpátok) (2. ábra). A magyarországi gyűjtőhelyek egymástól 20-415 km távolságra vannak. Az erdélyi gyűjtőhely (Kászon) 460 km távolságra fekszik a hozzá legközelebbi magyarországi gyűjtőhelytől (Mikóháza). A vizsgált férgeket 2004-2015. években gyűjtöttük.



2. ábra. Magyarországi tüdőférgek gyűjtési helyei, a különböző gazdafajok jelölésével. A férgeket 2004. és 2015. között gyűjtöttük.

A genetikai vizsgálatba vont fereg ivarát mikroszkóp alatt határoztam meg. A begyűjtött tüdőférgek közül 312 példányból tisztítottam ki DNS-t molekuláris vizsgálatok céljára, közülük 142 feregből származnak a munkámban felhasznált DNS szekvenciák (1. táblázat). A gímszarvasnak kiemelt jelentősége van a hazai vadgazdálkodásban, illetve e szarvasféle tüdőfereg fertőzöttsége nagyobb, mint a dámé és őzé, ezért a gímszarvas nagyobb mértékben reprezentált a mintavételezésnél.

A kifejlett nagy tüdőférges a tüdő hörgőiben élnek, többnyire a hörgők végső, rekeszi szakaszában találhatók (ld. 2.4 fejezet). A vizsgálataimban felhasznált férgek vadászatok során lőtt szarvasokból származnak. Vagy aznap elejtett szarvasok tüdejéből vettük ki a még élő tüdőférgeseket, vagy fagyasztott tüdőkből. A mélyhűtőben tárolt tüdőkből kioltatás után is épségben lehetett kisorsolni a férgeseket. A tüdő hörgőit, hörgőcskéit a légső felől nyitottuk fel késsel vagy ollóval, és csipesszel emeltük ki a tüdő légjárataiból a 3-7 cm-es férgeseket. A tüdőből kiemelt férgeseket izotóniás sóoldatban (0,9 g/L NaCl vizes oldatban) mostuk tisztára. A sóoldatban történő mosással eltávolítjuk a férgek felszínére tapadt, gazdaállatból származó szövetdarabokat, vért. Ezután abszolút vagy 96%-os etanolban, mélyhűtőben -20°C-on tároltuk a férgeseket a DNS kivonásig, illetőleg a morfológiai preparátum készítéséig.

1. táblázat. DNS szekvencia elemzésekhez felhasznált férgek gyűjtési adatai.

| parazita faj | parazita gyűjtési adatai (tüdőférges) | | | | | gazdaállat adatai (szarvas) | | | | GenBank azonosító szám cox1 (ITS2) |
|-------------------------------|---------------------------------------|------------------|-------------|------------|------------------|-----------------------------|---------------------|------------------|-------|---------------------------------------|
| | No. p | Helység | Megye | Dátum | i v a r | No. g | faj | i v a r | kor | |
| <i>Dictyocaulus capreolus</i> | D22 | Zselic | Somogy | 2005.03.29 | ♀ | G14 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372264 |
| | D30 | Szentpéter-földe | Zala | 2009.02.13 | ♂ | G19 | <i>C. capreolus</i> | ♀ | juv. | KT372266 |
| | D33 | Edde | Somogy | 2010.02.09 | ♀ | G22 | <i>C. capreolus</i> | ♀ | adult | KT372262 |
| | D37 | Edde | Somogy | 2008.04.27 | - | G26 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372255 |
| | D82 | Szentpéter-földe | Zala | 2009.02.13 | ♀ | G19 | <i>C. capreolus</i> | ♀ | adult | KT372267 (KT438071) |
| | D83 | Szentpéter-földe | Zala | 2009.02.13 | ♀ | G19 | <i>C. capreolus</i> | ♀ | adult | KT372256 |
| | D93 | Abádszalók | J.N.Szolnok | 2010.12.12 | - | G50 | <i>C. capreolus</i> | - | juv. | KT372257 |
| | D94 | Abádszalók | J.N.Szolnok | 2010.12.12 | - | G50 | <i>C. capreolus</i> | - | juv. | KT372261 |
| | D96 | Abádszalók | J.N.Szolnok | 2010.12.12 | - | G50 | <i>C. capreolus</i> | - | juv. | KT372251 |
| | D104 | Tiszapüspök | J.N.Szolnok | 2010.12.23 | ♀ | G51 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372253 |
| | D187 | Orci | Somogy | 2011.04.25 | ♀ | G53 | <i>C. capreolus</i> | ♀ | juv. | KT372265 |
| | D188 | Orci | Somogy | 2011.04.25 | ♀ | G53 | <i>C. capreolus</i> | ♀ | juv. | KT372263 |
| | D189 | Abádszalók | J.N.Szolnok | 2011.04.25 | ♀ | G54 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372260 |
| | D190 | Abádszalók | J.N.Szolnok | 2011.04.25 | ♀ | G54 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372254 |
| | D193 | Abádszalók | J.N.Szolnok | 2011.04.25 | ♀ | G55 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372258 |
| | D197 | Abádszalók | J.N.Szolnok | 2011.04.25 | ♂ | G56 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372259 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|------|------------|-------------|------------|---|-----|---------------------|---|-------|------------------------|
| <i>Dictyocaulus eckerti</i> | D198 | Abádszalók | J.N.Szolnok | 2011.04.25 | ♂ | G57 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372252 |
| | D1 | Herend | Veszprém | 2005.12.10 | ♀ | G1 | <i>C. elaphus</i> | - | adult | KT372337 |
| | D2 | Herend | Veszprém | 2005.12.10 | ♀ | G1 | <i>C. elaphus</i> | - | adult | KT372336 |
| | D4 | Herend | Veszprém | 2005.12.10 | ♀ | G2 | <i>C. elaphus</i> | - | adult | KT372331 |
| | D5 | Gyulaj | Somogy | 2004.01.15 | - | G3 | <i>D. dama</i> | - | adult | KT372328 |
| | D11 | Kab-hegy | Veszprém | 2005.01.27 | - | G6 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372273 |
| | D13 | Lábod | Somogy | 2005.03.09 | ♂ | G7 | <i>D. dama</i> | ♀ | adult | KT372302 |
| | D14 | Lábod | Somogy | 2005.03.09 | ♂ | G7 | <i>D. dama</i> | ♀ | adult | KT372346 |
| | D15 | Lábod | Somogy | 2005.03.04 | ♀ | G8 | <i>D. dama</i> | - | adult | KT372320 |
| | D19 | Högyész | Tolna | 2006.01.14 | ♀ | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372293 |
| | D21 | Sükösd | Tolna | 2006.01.12 | ♀ | G13 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372341 |
| | D23 | Zselic | Somogy | 2005.03.29 | ♂ | G14 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372311 |
| | D24 | Kászon | K-Kárpátok | 2005.09.28 | ♀ | G15 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372268 (KT438070) |
| | D25 | Kászon | K-Kárpátok | 2005.09.28 | - | G15 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372314 |
| | D26 | Kászon | K-Kárpátok | 2005.09.28 | ♀ | G15 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372287 |
| | D27 | Gálosfa | Somogy | 2006.11.08 | ♀ | G16 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372307 |
| | D28 | Gálosfa | Somogy | 2006.11.08 | ♀ | G17 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372313 |
| | D31 | Gálosfa | Somogy | 2007.12.07 | ♀ | G20 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372319 |
| | D34 | Lábod | Somogy | 2008.06.06 | ♀ | G23 | <i>C. elaphus</i> | - | - | KT372308 |
| | D36 | Böszénfa | Somogy | 2006.11.20 | ♀ | G25 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372277 |
| | D41 | Gemenc | Tolna | 2006.01.25 | ♀ | G30 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372292 |
| | D43 | Högyész | Tolna | 2006.01.12 | - | G32 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372343 |
| | D45 | Kab-hegy | Veszprém | 2005.01.27 | ♀ | G6 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372272 |
| | D47 | Högyész | Tolna | 2006.01.14 | ♀ | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372269 |
| | D48 | Högyész | Tolna | 2006.01.14 | ♂ | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372291 |
| | D49 | Högyész | Tolna | 2006.01.14 | ♀ | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372316 |
| | D50 | Högyész | Tolna | 2006.01.14 | ♀ | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372317 |
| | D52 | Högyész | Tolna | 2006.01.14 | - | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372315 |
| | D53 | Högyész | Tolna | 2006.01.14 | ♀ | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372297 |
| | D54 | Högyész | Tolna | 2006.01.14 | ♀ | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372295 |
| | D55 | Gemenc | Tolna | 2006.01.25 | ♀ | G34 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372279 |
| | D56 | Sükösd | Tolna | 2006.01.12 | ♂ | G35 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372305 |
| | D57 | Zselic | Somogy | 2005.03.29 | ♀ | G36 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372288 |
| | D58 | Zselic | Somogy | 2005.03.29 | ♀ | G14 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372339 |
| | D59 | Zselic | Somogy | 2005.03.29 | ♀ | G14 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372323 |
| | D60 | Zselic | Somogy | 2005.03.29 | ♂ | G14 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372294 |
| | D62 | Zselic | Somogy | 2005.06.22 | - | G37 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372340 |
| | D63 | Zselic | Somogy | 2005.06.22 | ♀ | G37 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372274 |
| | D64 | Zselic | Somogy | 2005.04.20 | ♀ | G38 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372345 |
| | D66 | Zselic | Somogy | 2005.04.20 | ♀ | G38 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372300 |
| | D67 | Kaszó | Somogy | 2009.12.13 | ♀ | G39 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | juv. | KT372329 |
| | D68 | Kaszó | Somogy | 2009.12.13 | ♀ | G39 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | juv. | KT372330 |
| | D69 | Kaszó | Somogy | 2010.01.29 | ♀ | G40 | <i>C. elaphus</i> | - | adult | KT372296 |
| | D70 | Kaszó | Somogy | 2010.01.29 | ♀ | G40 | <i>C. elaphus</i> | - | adult | KT372335 |
| | D71 | Kaszó | Somogy | 2010.01.29 | ♀ | G41 | <i>C. elaphus</i> | - | adult | KT372310 |
| | D79 | Kab-hegy | Veszprém | 2009.12.10 | ♀ | G45 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372322 |
| | D80 | Kab-hegy | Veszprém | 2009.12.10 | ♀ | G45 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372344 |
| | D81 | Kab-hegy | Veszprém | 2009.12.10 | ♀ | G45 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372342 |
| | D113 | Gemenc | Tolna | 2006.01.25 | ♀ | G30 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372324 |
| | D121 | Högyész | Tolna | 2006.01.12 | - | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372325 |
| | D133 | Zselic | Somogy | 2005.04.20 | ♀ | G38 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372271 |
| | D137 | Zselic | Somogy | 2005.04.20 | ♀ | G38 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372270 |
| | D140 | Kászon | K-Kárpátok | 2005.09.28 | ♂ | G15 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372321 |
| | D146 | Kászon | K-Kárpátok | 2005.09.28 | ♂ | G15 | <i>C. capreolus</i> | ♂ | adult | KT372281 |
| | D150 | Högyész | Tolna | 2006.01.12 | ♂ | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372290 |
| | D154 | Högyész | Tolna | 2006.01.12 | ♀ | G11 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372283 |
| | D155 | Zselic | Somogy | 2005.04.20 | ♀ | G38 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372338 |
| | D159 | Gálosfa | Somogy | 2007.12.07 | ♂ | G20 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372278 |

| | | | | | | | | | | |
|---|--------------------|--------------|-------------|------------|-----|-------------------|-------------------|---|-------|------------------------|
| | D169 | Gálosfa | Somogy | 2007.12.07 | ♂ | G20 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372327 |
| | D174 | Lábod | Somogy | 2005.03.04 | ♀ | G8 | <i>D. dama</i> | - | adult | KT372282 |
| | D175 | Lábod | Somogy | 2005.03.04 | ♀ | G8 | <i>D. dama</i> | - | adult | KT372326 |
| | D203 | Ajka | Veszprém | 2012.01.14 | ♀ | G60 | <i>C. elaphus</i> | - | adult | KT372275 |
| | D204 | Ajka | Veszprém | 2012.01.14 | - | G60 | <i>C. elaphus</i> | - | adult | KT372286 |
| | D257 | Nagyalá-sony | Veszprém | 2012.11.26 | ♀ | G69 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | juv. | KT372280 |
| | D260 | Nagyalá-sony | Veszprém | 2012.11.26 | - | G69 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | juv. | KT372318 |
| | D263 | Lábod | Somogy | 2013.01.20 | ♀ | G71 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | juv. | KT372285 |
| | D264 | Lábod | Somogy | 2013.01.20 | ♂ | G71 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | juv. | KT372306 |
| | D265 | Lábod | Somogy | 2013.01.20 | ♂ | G71 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | juv. | KT372309 |
| | D268 | Lábod | Somogy | 2013.01.20 | ♀ | G72 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | juv. | KT372284 |
| | D270 | Lábod | Somogy | 2013.01.20 | - | G73 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372303 |
| | D271 | Lábod | Somogy | 2013.01.20 | - | G73 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372304 |
| | D272 | Simonfa | Somogy | 2013.01.25 | ♀ | G74 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372301 |
| | D273 | Simonfa | Somogy | 2013.01.25 | ♀ | G74 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372289 |
| | D274 | Simonfa | Somogy | 2013.01.25 | ♀ | G74 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372312 |
| | D302 | Pálháza | Zemplén | 2014.09.23 | ♀ | G83 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372298 |
| | D306 | Pálháza | Zemplén | 2014.09.23 | ♀ | G83 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372299 |
| D. sp. n. | D307 | Mikóháza | Zemplén | 2014.09.24 | ♀ | G84 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372333 |
| | D308 | Mikóháza | Zemplén | 2014.09.24 | ♀ | G84 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372276 |
| | D309 | Mikóháza | Zemplén | 2014.09.24 | ♀ | G84 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372332 |
| | D311 | Mikóháza | Zemplén | 2014.09.24 | ♀ | G84 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372334 |
| | D18 | Högyész | Tolna | 2006.01.12 | - | G10 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372247 (KT438069) |
| | D42 | Gemenc | Tolna | 2006.01.10 | ♀ | G31 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372244 |
| | D44 | Högyész | Tolna | 2006.01.12 | ♀ | G33 | <i>C. elaphus</i> | ♂ | adult | KT372249 |
| | D46 | Högyész | Tolna | 2006.01.12 | ♀ | G32 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372245 |
| | D118 | Gemenc | Tolna | 2006.01.10 | ♀ | G31 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372250 |
| | D119 | Gemenc | Tolna | 2006.01.10 | ♀ | G31 | <i>C. elaphus</i> | ♀ | adult | KT372246 |
| | D166 | Gálosfa | Somogy | 2007.12.07 | ♀ | G20 | <i>C. elaphus</i> | - | juv. | KT372248 |
| | D75, Kaszó | Somogy | 2010.01.29 | ♀ | G43 | <i>C. elaphus</i> | - | - | | |
| | D77, Kaszó | Somogy | 2010.01.29 | ♀ | G44 | <i>C. elaphus</i> | - | - | | |
| | D87, Zselic | Somogy | 2009.12.15 | - | G47 | <i>C. elaphus</i> | - | - | | |
| | D88, Zselic | Somogy | 2009.12.15 | - | G48 | <i>C. elaphus</i> | - | - | | |
| Elaphostron- gylus cervi | D205 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | ♂ | G61 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D277 Zselic | Somogy | 2012.01.10 | - | G75 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| Metastrongylus assymmetricus | D84, Kab- hegy | Veszprém | 2009.12.10 | ♂ | G46 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D210 Ajka | Veszprém | 2012.01.30 | ♀ | G63 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| Metastrongylus confusus | D242 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | - | G67 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D245 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | - | G67 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D246 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | ♀ | G67 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D254 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | - | G68 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D243 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | ♀ | G67 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D248 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | ♀ | G67 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| Metastrongylus elongatus | D281 Zselic | Somogy | 2012.01.10 | - | G77 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D218 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | ♀ | G64 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D221 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | ♂ | G64 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| Metastrongylus pudendotectus | D233 Ajka | Veszprém | 2012.01.30 | ♀ | G66 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D284 Zselic | Somogy | 2012.01.10 | - | G78 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D85, Kab- hegy | Veszprém | 2009.12.10 | ♂ | G46 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| Metastrongylus salmi | D86, Kab- hegy | Veszprém | 2009.12.10 | ♀ | G46 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D111 Abádszalók | J.N.Szolnok | 2011.0.2.04 | ♂ | G52 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D201 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | - | G58 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D202 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | ♂ | G59 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | D207 Ajka | Veszprém | 2012.01.30 | ♂ | G62 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | | |
| | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|--|-----------|----------|------------|---|-----|-------------------|---|---|--|
| | D217 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | ♂ | G64 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | |
| | D222 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | - | G64 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | |
| | D244 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | ♂ | G67 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | |
| | D247 Ajka | Veszprém | 2012.01.21 | ♀ | G67 | <i>Sus scrofa</i> | - | - | |

No. p: parazita egyed azonosító száma, No. g: gazda egyed azonosító száma, ♀: hermafrodita, juv.: egy évnél fiatalabb, adult: egy évnél idősebb

4.1.3. DNS vizsgálatok

4.1.3.1. DNS kivonás

Mivel a *Dictyocaulus* példányokon csak a feji és farki végen található morfológiai jellegzetesség (Divina és mtsai, 2000), ezért a férgek középső részéből vágtam le steril szikével kb. 1-1 cm-es darabokat a DNS vizsgálatokhoz. A feji illetve farki véget 96%-os etanolban tároltam további morfológiai vizsgálatokhoz. Az első néhány *Dictyocaulus* féregből kétféle DNS kivonást is kipróbáltam, amiből hamarosan kiderült, hogy melyik ad jobb minőségű tisztított DNS-t. Az 5% Chelex-es DNS extrakció csak kis mennyiségű PCR terméket adott, így ezt a módszert nem részletezem. Tapasztalatom alapján a Chelex-es DNS extrakció csak nagyon kis mennyiségű minta esetén alkalmazható DNS kivonásra. A továbbiakban Qiagen DNeasy Tissue DNS tisztító kittet használtam a használati útmutató szerint (QIAGEN, kat. sz. 69504). A sejtek minél jobb feltárása érdekében steril szénporral vagy kvarchomokkal dörzsöltem el a mintákat. A szövetek szétdörzsölését egyszer használatos polipropilén homogenizálóval végeztem. Dámvadból származó, 1999-ben gyűjtött, formalinban tárolt mintákból is próbáltam DNS-t kivonni, de sikertelen volt e próbálkozás.

4.1.3.2. PCR

Öt különböző DNS fragmentumot választottam ki a hazai *Dictyocaulus* férgek genetikai vizsgálatához: genomiális 18S rDNS, 28S rDNS, ITS2, MSP1 és mitokondriális cox1 génhelyek. Az ITS2 szekvenciákkal

végezték a nagy tüdőférgek legkorábbi DNS nukleotid sorrend elemzését, faji elkülönítő markerként. Ezért munkám során a hazai szarvasok tüdőféreg fajainak molekuláris jellemzésére szintén alkalmaztam az ITS2 lókuszt szekvenciáit. A *Dictyocaulus* férgek ITS2 PCR-rel meglehetősen sok probléma adódott. Alapvetően Johnson és mtsai (2003) munkája alapján végeztem a PCR-t. Eszerint, ha 3 mM $MgCl_2$ koncentrációt, és 60°C primer tapadási hőmérsékletet alkalmazunk, akkor csak egyféle ITS2 fragmentet, azaz csak egy sávot kapunk gélfuttatás után. Esetünkben DNS mintánként kellett a Mg^{++} koncentrációt és primer tapadási hőmérsékletet beállítani, ami elég sok PCR próbálkozást jelentett. Ezek az egyedi ITS2 fragmentumok körülbelül 500 bp hosszúságúak voltak. E PCR fragmentumok közvetlen szekvenálása sikeres volt. Azokban az esetekben, amikor több sávot is kaptam egy-egy PCR-ből, az 500 bp körüli legerősebb sávot kivágtam a gélből és abból tisztítottam ki az ITS2 fragmentet. 12 gélből kitisztított mintát próbáltam szekvenálni, de mindegyik sikertelen volt. Az oka az lehet, hogy e férgekben az egyeden belüli ITS2 szakaszok variábilisek, ami akadályozza a PCR termékek direkt szekvenálását. E variabilitás oka, hogy a riboszomális gének több százszor is tandem ismétlődhetnek és e gének bázissorrendjei nem teljesen azonosak. A különbségek többnyire a mikroszatellit részek ismétléseinek változásából fakadnak, ami a kromatogramokon jól kivehetőek. A különböző számú mikroszatellit ismétlődésű fragmentkeverék közvetlen szekvenálása a mikroszatellit eltérések miatt dupla csúcsokat eredményez a szekvenálási kromatogramokon. Ezeket a zavarokat küszöböltem ki a PCR termékek klónozásával, azaz egy alkalmas plazmidba illesztettem, majd *E. coli* baktérium sejttel szaporítottam fel. Ebben az esetben gyakorlatilag egyetlen DNS molekulát szaporítottam fel (klónozás), aminek a kromatogramja, azaz a

bázissorrendje már egyértelműen leolvasható volt. Ezt a klón szekvenálást alkalmazták tüdőférgesknél Epe és mtsai (1997), azonban Höglund és mtsai (1999) vitatták a módszert, ugyanis a klónozás elfedi a PCR indukálta hibákat (Taq polimeráz átírási hibái) és nem mutatja a valós egyeden belüli variabilitást. Höglund és mtsai (1999) a PCR termékek közvetlen szekvenálását javasolták. Ezért az elemzéseimbe csak a direkt szekvenálással kapott ITS2 szekvenciákat vontam be.

Az élővilág legjobban kutatott “barcoding” genetikai markerével való összehasonlíthatóság érdekében a *cox1* gén univerzális primereit használtam, mely a *cox1* gén 5’ végi felének mintegy 660 bp szakaszát fedile (a *cox1* gén teljes hossza kb. 1500 bp).

A férgek genomiális DNS-nek 150 µl Qiagen DNeasy Tissue kit TE pufferrel történő leoldásából 1-1 µl-t használtam egy-egy PCR reakcióhoz. Az 5 különböző DNS fragment felszaporításához az 2. táblázatban listázott primereket használtam. Minden PCR-t 25 µl végtérfogóban mértem össze a következők szerint:

| | |
|---------------------------------------|----------|
| 10 x PCR puffer (Fermentas) | 2,5 µl |
| MgCl ₂ (25mM, Fermentas) | 1,5-3 µl |
| dNTP (2,5 mM, Fermentas) | 2 µl |
| Forward primer (10 pmol/µl) | 0,6 µl |
| Reverz primer (10 pmol/µl) | 0,6 µl |
| Taq DNS polimeráz (5 U/µl, Fermentas) | 0,2 µl |
| DNS templát (2-10 ng/µl) | 1 µl |

MJ Research PTC100 vagy Peqlab grádiens PCR berendezést használtam a következő hőmérsékleti program alapján:

- kezdeti denaturáció 94°C-on 2 perc,
- 30-40 ciklus: denaturáció 94°C 30 másodperc, primer tapadás (annealing) 48-68°C 30 másodperc, átírás (elongáció) 72°C 30-60 másodperc,
- végső átírás 72°C-on 5 perc.

2. táblázat. Az elemzésbe vont 5 különböző DNS szakasz rövidítései, PCR reakciókban használt primerek kódja, primerek szekvenciája és referenciája.

| Lókuszt | Primer neve | Primer szekvenciája | Referencia |
|----------|-------------|----------------------------------|------------------------|
| 18S rDNS | 18S1Afw | 5'-GGCGATCGAAAAGATTAAGCCATGCA-3' | Carreno és mtsai, 2009 |
| | 136rev | 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3' | |
| 28S rDNS | 391 fw | 5'-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3' | Carreno és mtsai, 2009 |
| | 501 rev | 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3' | |
| ITS2 | ITS2F | 5'-ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT-3' | Höglund és mtsai, 1999 |
| | ITS2R | 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3' | |
| MSP1 | OP433 | 5'-CAAACAATGGCGTCAGTTCCC-3' | Höglund és mtsai, 2008 |
| | OP434 | 5'-GCATAGTGTATAACCACCATGC-3' | |
| cox1 | LCO1490 | 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' | Folmer és mtsai, 1994 |
| | HCO2198 | 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' | |

A primer tapadási hőmérsékletet gyakran változtattam DNS mintától függően 48-68°C között. Negatív kontrollt minden esetben készítettem, melybe templát DNS-t nem raktam. A PCR eredményességét 1,5%-os agaróz gélen (GIBCO) ellenőriztem. A PCR mixből 2-2 µl-t futtattam agaróz gélen, melyet etídium-bromiddal festettem, majd UV fény alatt UVP géldokumentációs rendszerrel fotóztam.

4.1.3.3. PCR termék tisztítása

Azokat a PCR termékeket, melyek gélfuttatáskor csak egy sávot adtak, SAP+ExoI (USB) enzimekkel tisztítottam ki a PCR reakció elegyből. Néhány esetben azokat az ITS2 fragmenteket, melyek gélfuttatásakor több sávot adtak, gélből kivágás után Qiagen Gel Extrakciós kittel tisztítottam. A végső DNS leoldási lépést 20 µl ddH₂O-val végeztem, hogy a tisztított DNS közvetlenül szekvenálható koncentrációban legyen. A vízben oldott DNS termékek koncentrációinak becsléséhez 1-1 µl-t futtattam agaróz gélen ismert koncentrációjú mólsúly markerek (Fermentas) mellett.

4.1.3.4. DNS szekvenciák

A célkitűzéseim 1 - 3. pontjainak megválaszolásához mind az 5 genetikai lókusz DNS szekvenciáit használtam fel (cox1, ITS2, 18S rDNS, 28S rDNS, MSP1). A célkitűzéseim 4-5. pontjaihoz a cox1 gén szekvenciákat elemeztem. A tisztított PCR termékek nukleotid sorrendjét Sanger szekvenálással határoztuk meg (BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit, Life Technologies). Minden esetben két oldalról történt a szekvenálás a PCR-ben alkalmazott primerekkel külön-külön.

A korábbi tanulmányokból származó *Dictyocaulus* DNS szekvenciákat az internetes GenBank adatbázisból töltöttem le (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), hogy e szekvenciákkal hasonlítsam össze mintáim nukleotid sorrendjeit. A GenBank minden olyan *Dictyocaulus* és közeloikon fereg szekvenciáját bevontam az összehasonlító vizsgálatba, mely hasonlított az általam vizsgált DNS fragmentumokkal (3. táblázat).

3. táblázat. DNS szekvencia elemzésekhez felhasznált, GenBank-ból letöltött *Dictyocaulus* és filogenetikailag rokon férgek (külcsoport) szekvenciáinak listája a GenBank elérési kóddal, a fereg gazdaállatával, származási helyének országával, publikációjának hivatkozásával.

| fajnév | GenBank azonosító | gazdafaj | gyűjtőhely | referencia |
|---------------------------------|----------------------|-------------------------------------|-------------|------------------------|
| ITS2 <i>Dictyocaulus</i> | | | | |
| <i>D. filaria</i> | AJ580770 | juh (<i>Ovis aries</i>) | Új-Zéland | Johnson és mtsai, 2004 |
| <i>D. filaria</i> | AY439020 | juh (<i>O. aries</i>) | Anglia | Wimmer és mtsai, 2003 |
| <i>D. filaria</i> | U37717 | juh (<i>O. aries</i>) | Németország | Epe és mtsai, 1997 |
| <i>D. arnfieldi</i> * | U37715 | szamár (<i>Equus asinus</i>) | Németország | Epe és mtsai, 1997 |
| <i>D. eckerti</i> | U37716 | dám (<i>Dama dama</i>) | Németország | Epe és mtsai, 1997 |
| <i>D. capreolus</i> | AF105256 | jávorszarvas (<i>Alces alces</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 1999 |
| <i>D. capreolus</i> | AF105255 | őz (<i>Capreolus capreolus</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 1999 |
| <i>D. sp. P6</i> | AJ580764 | gím (<i>Cervus elaphus</i>) | Új-Zéland | Johnson és mtsai, 2004 |
| <i>D. sp. P6A1</i> | AY168865 | dám (<i>D. dama</i>) | Németország | Höglund és mtsai, 2003 |
| <i>D. sp. p11</i> | AJ580765 | gím (<i>C. elaphus</i>) | Új-Zéland | Johnson és mtsai, 2004 |
| <i>D. sp. p70</i> | AJ580766 | gím (<i>C. elaphus</i>) | Új-Zéland | Johnson és mtsai, 2004 |
| <i>D. sp. p163</i> | AJ580767 | szarvasmarha (<i>Bos</i>) | Új-Zéland | Johnson és mtsai, 2004 |

| | | | | |
|-------------------------------|----------|---|---------------|-------------------------|
| | | <i>taurus</i>) | | |
| <i>D. sp. ph104</i> | AJ580768 | szarvasmarha (<i>B. taurus</i>) | Új-Zéland | Johnson és mtsai, 2004 |
| <i>D. sp. ph111</i> | AJ580769 | szarvasmarha (<i>B. taurus</i>) | Új-Zéland | Johnson és mtsai, 2004 |
| <i>D. viviparus</i> | AF105257 | szarvasmarha (<i>B. taurus</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 1999 |
| <i>D. viviparus</i> | U37718 | szarvasmarha (<i>B. taurus</i>) | Németország | Epe és mtsai, 1997 |
| ITS2 külsőport | | | | |
| <i>Elaphostrongylus alces</i> | AF504028 | jávorszarvas (<i>A. alces</i>) | Svédország | Gajadhar és mtsai, 2000 |
| <i>E. alces</i> | AF504034 | jávorszarvas (<i>A. alces</i>) | Svédország | Gajadhar és mtsai, 2000 |
| <i>E. cervi</i> | AF504026 | gím (<i>C. elaphus</i>) | Új-Zéland | Gajadhar és mtsai, 2000 |
| <i>E. cervi</i> | AF504032 | gím (<i>C. elaphus</i>) | Új-Zéland | Gajadhar és mtsai, 2000 |
| <i>E. rangiferi</i> | AF504027 | rénszarvas (<i>Rangifer tarandus</i>) | Kanada | Gajadhar és mtsai, 2000 |
| <i>E. rangiferi</i> | AF504033 | rénszarvas (<i>R. tarandus</i>) | Kanada | Gajadhar és mtsai, 2000 |
| <i>E. rangiferi</i> | AY648408 | rénszarvas (<i>R. tarandus</i>) | Kanada | Jenkins és mtsai, 2005 |
| <i>E. rangiferi</i> | EU018482 | rénszarvas (<i>R. tarandus</i>) | Kanada | Jenkins és mtsai, 2005 |
| 18S rDNA Dictyocaulus | | | | |
| <i>D. capreolus</i> | AY168862 | jávorszarvas (<i>A. alces</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 2003 |
| <i>D. capreolus</i> | AY168859 | őz (<i>C. capreolus</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 2003 |
| <i>D. sp. 1</i> | FJ589016 | őz (<i>C. capreolus</i>) | Spanyolország | Carreno és mtsai, 2009 |
| <i>D. sp. 2</i> | FJ589019 | zerge (<i>Rupicapra rupicapra</i>) | Spanyolország | Carreno és mtsai, 2009 |
| <i>D. sp. 3</i> | FJ589015 | gím (<i>C. elaphus</i>) | Spanyolország | Carreno és mtsai, 2009 |
| <i>D. filaria</i> | AY168861 | juh (<i>O. aries</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 2003 |
| <i>D. filaria</i> | AJ920362 | juh (<i>O. aries</i>) | USA | Chilton és mtsai, 2006 |
| <i>D. eckerti</i> | AY168864 | rén (<i>R. tarandus</i>) | Norvégia | Höglund és mtsai, 2003 |
| <i>D. eckerti</i> | AY168858 | gím (<i>C. elaphus</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 2003 |
| <i>D. eckerti</i> | AY168863 | pézsmatulok (<i>Ovibos moschatus</i>) | Alaszka | Höglund és mtsai, 2003 |
| <i>D. eckerti</i> | AY168857 | jávorszarvas (<i>A. alces</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 2003 |
| <i>D. viviparus</i> | KC771250 | európai bölény (<i>Bison bonasus</i>) | Lengyelország | Pyziel, 2014 |
| <i>D. viviparus</i> | AJ920361 | szarvasmarha (<i>B. taurus</i>) | - | Chilton és mtsai, 2006 |
| <i>D. viviparus</i> | AY168856 | szarvasmarha (<i>B. taurus</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 2003 |
| <i>D. sp. P6A1</i> | AY168860 | dámvad (<i>D. dama</i>) | Németország | Höglund és mtsai, 2003 |
| 18S rDNS külsőport | | | | |
| <i>Metastrongylus</i> | AJ920363 | vaddisznó (<i>Sus</i> | USA | Chilton és mtsai, 2006 |

| | | | | |
|-------------------------------------|----------|---------------------------------------|---------------|--------------------------------|
| <i>elongatus</i> | | <i>scrofa</i>) | | |
| <i>Metastrongylus salmi</i> | AY295809 | vaddisznó (<i>S. scrofa</i>) | USA | Carreno és Nadler, 2003 |
| 28S rDNA Dictyocaulus | | | | |
| <i>D. sp. 1</i> | FJ589017 | őz (<i>C. capreolus</i>) | Spanyolország | Carreno és mtsai, 2009 |
| <i>D. sp. 2</i> | FJ589018 | zerge (<i>R. rupicapra</i>) | Spanyolország | Carreno és mtsai, 2009 |
| <i>D. sp. 3</i> | FJ589014 | gím (<i>C. elaphus</i>) | Spanyolország | Carreno és mtsai, 2009 |
| <i>D. filaria</i> | AM039754 | juh (<i>O. aries</i>) | | Chilton és mtsai, 2006 |
| <i>D. viviparus</i> | AM039753 | szarvasmarha (<i>B. taurus</i>) | | Chilton és mtsai, 2006 |
| <i>D. noeneri</i> | AF210032 | őz (<i>C. capreolus</i>) | Franciaország | Gouy de Bellocq és mtsai, 2001 |
| <i>D. noeneri</i> | AF210007 | őz (<i>C. capreolus</i>) | Franciaország | Gouy de Bellocq és mtsai, 2001 |
| <i>Metastrongylus salmi</i> | AY292797 | vaddisznó (<i>S. scrofa</i>) | USA, San Jose | Carreno és Nadler, 2003 |
| cox1 Dictyocaulus | | | | |
| <i>D. eckerti</i> | JX519459 | gím (<i>C. elaphus</i>) | Új-Zéland | Gasser és mtsai, 2012 |
| <i>D. viviparus</i> | JX519460 | szarvasmarha (<i>B. taurus</i>) | Svédország | Gasser és mtsai, 2012 |
| cox1 külsőport | | | | |
| <i>Aelurostrongylus abstrusus</i> | JX519458 | macska (<i>Felis sylvestris</i>) | | Jabbar és mtsai, 2013b |
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | JN801161 | ember (<i>Homo sapiens</i>) | Dél-Korea | Park és mtsai, 2011 |
| <i>Ascaris suum</i> | HQ704901 | sertés (<i>S. scrofa domestica</i>) | Kína | Liu és mtsai, 2012 |
| <i>Bunostomum phlebotomum</i> | KF011546 | jak (<i>Bos grunniens</i>) | Kína | Gao és mtsai, 2014 |
| <i>Metastrongylus pudendotectus</i> | GQ888714 | vaddisznó (<i>S. scrofa</i>) | Észtország | Jex és mtsai, 2010 |
| <i>Metastrongylus salmi</i> | GQ888715 | vaddisznó (<i>S. scrofa</i>) | Észtország | Jex és mtsai, 2010 |
| <i>Necator americanus</i> | AJ556134 | ember (<i>Homo sapiens</i>) | Togo | Hu és mtsai, 2003 |
| <i>Protostrongylus rufescens</i> | KF481953 | juh (<i>O. aries</i>) | Australia | Jabbar és mtsai, 2013a |
| <i>Toxascaris leonina</i> | KC902750 | kutya (<i>Canis lupus fam.</i>) | Australia | Liu és mtsai, 2014 |
| MSP1 Dictyocaulus | | | | |
| <i>D. capreolus</i> | EU606070 | őz (<i>C. capreolus</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 2008 |
| <i>D. eckerti</i> | EU606060 | gím (<i>C. elaphus</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 2008 |
| <i>D. viviparus</i> | EU606100 | szarvasmarha (<i>B. taurus</i>) | Svédország | Höglund és mtsai, 2008 |
| MSP1 külsőport | | | | |
| <i>Oesophagostomum dentatum</i> | AJ627869 | sertés (<i>S. scrofa domestica</i>) | | Cottee és mtsai, 2004 |
| | AJ627870 | | | Cottee és mtsai, 2004 |
| | AJ627872 | | | Cottee és mtsai, 2004 |
| | AJ627873 | | | Cottee és mtsai, 2004 |

*Megjegyzés: Epe és mtsai (1997) *Dictyocaulus arnfieldi* név alatt szerepeltetik ezt a szekvenciát, mely számár tüdejében élő nagy tüdőféregből származik. A GenBank adatbázisban U37715 kódszám alatt *D. filaria* fajnév szerepel, valószínűleg hibásan! A szekvencia elemzések alapján meglehetősen eltér a többi *D. filaria* szekvenciától, így ez tekinthető *D. arnfieldi*-nek. A továbbiakban ezt a szekvenciát *D. arnfieldi* fajnév alatt szerepeltetem, mely e fajból ismert egyetlen DNS szekvencia.

4.1.4. Tüdőféreg fajok azonosítása

Mivel a *Dictyocaulus* fajok küllemi határozása kérdéses, DNS szekvenciák segítségével biztosabban határozható meg e paraziták faja. A molekuláris módszereket alkalmazó munkákban a vizsgált férgeket/féreg-csoportokat gyakran kódokkal jelölik, mivel az érvényes leírásuk szerinti faji hovatartozásuk bizonytalan. Így viszont egyre szaporodik a kódokkal jelölt tüdőféreg „fajok/törzsek” száma, melyeket általában DNS szekvenciákkal jellemeznek. A DNS szekvenciákkal jellemzett férgek már objektíven összevethetők, míg a morfológiai faji azonosításuk a kérdéses határozókulcsok miatt jelentős bizonytalansággal terhelt. A hazai szarvasok tüdőférgének DNS szekvenciáit különböző filogenetikai algoritmusokkal közelrokon csoportokba (MOTU) rendeztem. Az eddig leírt tüdőféreg fajok DNS szekvenciáival (GenBank) hasonlítottam össze a hazai szarvasokban előforduló tüdőféreg szekvencia klasztereket/MOTU-kat. A jelentősen elkülönült klaszterek/MOTU-k tekinthetők filogenetikai fajoknak. A klaszterek genetikai távolságának mértékéből következtethető az adott MOTU faji szintű elkülönültsége, korábbi tanulmányok tapasztalati értékeivel való összehasonlítás alapján (Blouin és mtsai, 2002).

4.2. Filogenetikai elemzés

Öt különböző DNS szakasz (lókus) DNS szekvenciáit határoztam meg különböző tüdőféreg fajokból, fajonként több példányból. A DNS szekvenátorból kapott kromatogramokat BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) programmal elemeztem. A bázispozíciókat manuálisan ellenőriztem,

illetve javítottam. Minden egyes PCR fragmentum szekvenálásból származó “forward” és “reverz” szekvenciából BioEdit programmal készítettem konszenzus szekvenciákat. A szekvenciák összeillesztését (alignment) MEGA6 (Tamura és mtsai, 2013) programcsomag részeként ClustalX v2.0 (Thompson és mtsai, 1997) és Muscle programokkal végeztem. Az 5 lókuszt filogenetikai elemzésével kapott fák gyakorlatilag génfáknak tekinthetők.

A megfelelő szubsztitúciós modell kiválasztását Modeltest (Posada és mtsai, 1998; Posada és Buckley 2004) programmal (ld. 5.2 fejezet), a Neighbor Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP) és Maximum Likelihood (ML) filogenetikai fakészítő módszereket szintén a MEGA6 programjaival végeztem (Hall, 2001). A konszenzus NJ, MP és ML fa-számolás egységesen 1000 bootstrap replikációból származott. A filogenetikai fák gyökereztetését kulcsoport kijelölésével végeztem. A kodon triplet 1., 2. és 3. pozíciójában eltérő gyakoriságú a szubsztitúciós ráta. Leggyakoribb a 3. pozíció báziscseréje, mert ez általában nem okoz aminosav cserét, amire nincs evolúciós szelekció. A *cox1* szekvenciák 1., 2. és 3. kodon pozícióira számoltam szubsztitúciós szaturációs analízist DAMBE5 programmal (Xia, 2013). Eszerint nem volt szignifikánsan telített szubsztitúcióval a 3. kodon pozíció sem ($P < 0,0001$), ezért a filogenetikai elemzésbe vonhattam a 3. kodon pozíciókat is.

A Bayes statisztikán alapuló filogenetikai analízist MrBayes 3.2.2 programmal végeztem (Ronquist és Huelsenbeck, 2003; Ronquist és mtsai, 2012). 4 párhuzamos láncon (1 cold, 3 heated) futtattam az öt különböző genetikai lókuszt filogenetikai számolását. A 2 millió generáción át számolt konszenzus fát minden 100. generáció paramétereiből átlagoltattam, az összes generáció első negyedének levonásával (burnin=25%). A *cox1* és *MSP1* proteinkódoló gének

szekvenciáinak elemzését “codon” alapon futtattam, a codon tripletek 1., 2. és 3. bázis pozícióit partícionálva. Az elkészült filogenetikai NJ, MP, ML fák megbízhatóságának tesztelésére a “bootstrap” analízist használtam. A Bayes filogenetikai fák elágazásaihoz a MrBayes program megadja a megbízhatósági (a posteriori valószínűségi) értékeket.

A cox1 és MSP1 gének aminosav sorrendjéből is Modeltest programmal választottam ki az adatkészletre legjobban illeszkedő szubsztitúciós modellt (ld. 5.2 fejezet), majd az aminosav sorrendből álló adatmátrixra is futtattam NJ, MP, ML és Bayes filogenetikai analízist szintén MEGA6 és Mrbayes 3.2.2 programokkal.

4.3. *Dictyocaulus* fajokat elkülönítő PCR alapú módszer

Munkám egyik gyakorlati alkalmazásának volt tekinthető, hogy találjak olyan PCR alapú eljárást, amellyel a szarvasfélékben élő, küllemileg nehezen vagy nem elkülöníthető *Dictyocaulus* féreg fajokat meg lehet különböztetni.

- a) Az olvadásponthoz tartozó PCR fragmentumok azonosságának/különbözőségének kimutatásához, mivel az eltérő nukleotid sorrendű PCR fragmentumok eltérő hőmérsékleti olvadásgörbét adnak, azaz a kettős szálú DNS más hőmérsékleti ponton válik szét két egyes szárra. Erre az „olvadási” folyamatra, azaz a fényelnyelés változás görbéjének meghatározására egyes Real-Time PCR készülékek is alkalmasak. Roche 480 RealTime PCR géppel végeztem 96 minta cox1 PCR fragmentjének olvadásgörbe analízisét. Azért választottam a cox1 markert olvadásponthoz tartozó analízishez, mert a kezdeti szekvenálási eredményekből kiderült, hogy a cox1 gén szekvenciája elég variábilis a tüdőféreg fajok/populációk elkülönítéséhez.

- b) PCR gyakran eltérő hosszúságú (bp) termékeket ad, mely hossz különbségek akár faji identifikációs markerként is használhatók. A PCR termékek agaróz vagy akrilamid gélen való futtatása során válnak láthatóvá a hosszkülönbségek.
- c) PCR termék restrikciós enzimmel való vágása gyakran alkalmazott faji detektálási módszer. A restrikciós emésztés utáni termékek gélen futtatása során kapott eltérő sávmintázatok adják a polimorfizmus értékeléséhez szükséges különbségeket. PCR-RFLP módszerrel próbáltam az MSP1, ITS2 PCR fragmentumokat elkülöníteni.
- d) RAPD módszert is alkalmaztam a *Dictyocaulus* fajok elkülönítésére. Azaz olyan RAPD primereket kerestem, mely fajra jellemző PCR fragmentumhossz polimorfizmust eredményez. Összesen 12 különböző RAPD primert próbáltam ki (4. táblázat). A RAPD PCR-t 25µl végtérfogatban az alábbi összetevőkből mértem be az 5. táblázat szerinti hőmérsékleti lépéseket alkalmazva.

| | |
|--|--------|
| 10 x PCR puffer (2 mM MgCl ₂ , Fermentas) | 2,5 µl |
| dNTP (2,5 mM) | 2 µl |
| RAPD 10mer primer (10 pmól/µl) | 0,6 µl |
| Taq DNS polimeráz (5 U/µl, Fermentas) | 0,2 µl |
| DNS templát (2-10 ng/µl) | 1 µl |

Minden *Dictyocaulus* DNS mintára a RAPD analízist kétszer végeztem el. Minden PCR elegy összeméréséhez ugyanazon típusú összetevőket és egyetlen PCR készüléket használtam (Peqlab). Ezen körülmények közt jól ismételtetőek voltak a fereg egyedekre jellemző RAPD mintázatok. Az ismétlések során a RAPD mintázatok sávjainak (PCR fragmentumok) megléte nem változott, csupán intenzitásbeli különbségeket tapasztaltam.

4. táblázat. RAPD PCR során alkalmazott 10mer primerek elnevezései, nukleotid szekvenciái.

| primer kód | primer szekvencia (5' – 3') |
|------------|-----------------------------|
| OPA-02 | TGCCGAGCTG |
| OPA-05 | AGGGGTCTTG |
| OPA-07 | GAAACGGGTG |
| OPB-01 | GTTTCGCTCC |
| OPB-08 | GTCCACACGG |
| OPC-07 | GTCCCGACGA |
| OPQ-05 | CCGCGTCTTG |
| OPW-08 | GA CTGCCTCT |
| OPY-07 | AGAGCCGTCA |
| OPAA-1 | AGACGGCTCC |
| OPAA-2 | GAGACCAGAC |
| OPAA-3 | TTAGCGCCCC |

5. táblázat. RAPD PCR „touch down” hőmérsékleti lépések.

| | 1-2 ciklus | 3-4. ciklus | 5-6. ciklus | 7-8. ciklus | 9-10. ciklus | 11-12. ciklus | 13-40. ciklus |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|---------------|---------------|
| denaturáció | 94°C, 30'' | 94°C, 30'' | 94°C, 30'' | 94°C, 30'' | 94°C, 30'' | 94°C, 30'' | 94°C, 30'' |
| primer tap. | 45°C, 1' | 44°C, 1' | 43°C, 1' | 42°C, 1' | 41°C, 1' | 40°C, 1' | 37°C, 1' |
| átírás | 72°C, 1' | 72°C, 1' | 72°C, 1' | 72°C, 1' | 72°C, 1' | 72°C, 1' | 72°C, 1' |

4.4. Gazdafajlagosság

A jelen munkából származó DNS szekvenciák és RAPD módszerrel faji szinten meghatározott *Dictyocaulus* példányok alapján, illetve szakirodalmi közleményekből összegyűjtött, molekuláris markerekkel igazolt gazda-parazita kapcsolatokat elemeztem.

4.5. Populációgenetikai elemzések

A hazai nagy tüdőféreg populációk struktúrájának, génáramlásának becslését a *cox1* szekvenciák nukleotid polimorfizmusából számoltam. DnaSP program 5. verzióját (Librado és Rozas, 2009) használtam a genetikai diverzitást jellemző értékek számolásához: polimorf pozíciók száma fajon belül (*S*), GC nukleotid tartalom (GC), haplotípus szám (*H*), csoporton belüli átlagos nukleotid különbség (*K*), nukleotid diverzitás (π). Ugyancsak DnaSP programmal mértem a genetikai variabilitást fajok között, fajon belül, illetőleg populációk között 4 vizsgálati szinten: (1)

egy gazdaegyedben levő fereg populációk szintjén (infrapopuláció), (2) kis léptékű lokális, (3) nagyobb léptékű regionális (megye) térbeli populációk szintjén, illetve (4) gazdafajok szerint megkülönböztetett populációk szintjén. A csoport/populáció specifikációt a 5.5.3. fejezet részletezi. A populációk közti differenciálódás (struktúra) és génáramlás elemzését szintén DnaSP szoftverrel végeztem. A vizsgált szinteken feltételezett populációk differenciálódását a Hudson, Slatkin és Maddison (1992) féle fixációs indexszel (F_{ST}) jellemeztem. Az F_{ST} a populációk közti differenciáltságot számszerűsíti, azaz kifejezi a fajon belül, a populációk közti elkülönültség mértékét. Az F_{ST} -t széles körben használják a fajon belüli genetikai strukturáltság jellemzésére (Hartl és Clark, 1997). Nei-féle G_{ST} szintén a genetikai differenciáltság jellemzésére számolt paraméter (Nei, 1973), mely a haplotípus gyakoriságból számolt F_{ST} hányadoshoz hasonló. Az N_{ST} szintén a populációk strukturáltságát mutatja a nukleotid diverzitásból számolva (Lynch és Crease, 1990). A populációk közti génáramlás jellemzésére az Nm értéket használtam, ami az átlagos effektív migráns egyedek száma generációnként, F_{ST} differenciáltságból számolva. Az Nm a populáció effektív egyedszámának (N : azon egyedek, melyek részt vesznek a szaporodásban) és a mutációs rátának a (m) szorzata, megadja a populációba bevándorló migráns egyedek számát. A differenciáltsági paraméterek megmutatják, tesztelik, hogy a 4 szint szerint felállított *a priori* populációk valóban elkülönült genetikai egységek-e, vagy sem.

Filogenetikai és biológiai jellegek közti kapcsolatok

A vizsgált férgek jellegzetességei (gazdafaj, földrajzi gyűjtőhely) és a filogenetikai törzsfá által kimutatott rokon tüdőféreg csoportok közt kerestem összefüggéseket. A *cox1* szekvenciák illesztését ClustalX 2.0 verzió programmal végeztem (Thompson és mtsai 1997). Modeltest

(Posada és mtsai, 1998) programmal választottam ki a legvalószínűbb szekvencia evolúciós modellt Akaike és Bayes információs kritériumok alapján (AIC, BIC). Az adatmátrixra a Hasegawa, Koshino és Yano modell illeszkedett a legjobban, gamma eloszlású szubsztitúciós rátákkal és az invariábilis nukleotid pozíciók arányának figyelembevételével (HKY+G+I). A modell egyenlőtlen bázis gyakoriságok és változó szubsztitúciós ráták felhasználásával számol. A populációgenetikai elemzésben felhasznált *cox1* szekvenciákra MEGA6 programmal ML törzsfát állítottam fel, a mintázott tüdőférgek közti evolúciós kapcsolatok ábrázolásához. A törzsfa elágazásainak valószínűségét 1000 bootstrap ismétlés becsülte.

A populáció nagyságok múltbeli változásait ugyancsak DnaSP szoftverrel becsültem a genetikai diverzitásból számolva. Tajima D (Tajima, 1989) és Fu F_s (Fu, 1997) paramétereit használtam a populáció Hardy-Weinberg egyensúlyi állapottól való eltérésnek mutatóiként, azaz a populáció csökkenésének vagy növekedésének jellemzésére. Tajima D érték a szegregáló pozíciók száma és páronkénti szekvencia különbségek eltérésén, míg Fu F_s értéke a haplotípusok gyakoriságának eloszlásán alapszik. DnaSP programmal számolva 10000 ismétléses szimulációból becsültem a Tajima D és Fu F_s értékeket. Pozitív értékek mindkét paraméterre a populáció csökkenésére utalnak, míg negatív értékek a populáció expanzióját jelzik. Fu F_s értéke érzékenyebb a demográfiai változásokra (Ramos-Onsins és Rozas, 2002). A *cox1* szekvencia különbségekből számoltam ún. 'mismatch' eloszlást (minták DNS szekvenciáinak páronkénti nukleotid különbség eloszlása) a populáció nagyság múltbeli történetének rekonstruálására (Slatkin és Hudson, 1991). A 'mismatch' eloszlási görbe csúcsosságára ún. 'raggedness' r statisztikát is számoltam (Harpending és mtsai, 1993). Az expandáló

populációkra a legközelebbi közös őstől való elválás idejének becslését (Time to Most Recent Common Ancestor, tMRCA) ugyancsak elvégeztem cox1 szekvencia adatmátrixra.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Morfológia

A tüdőférgek morfológiai vizsgálatával már több publikáció is foglalkozott, de nem találtak e fonálférgeken fajhatározási bélyegeket. A szarvasfélékben élő *Dictyocaulus* fajok morfológiai összehasonlításáról alapos munkát közöltek Divina és mtsai (2000). Megemlítendő, hogy csak kevés karaktert vizsgáltak, elsősorban a szájtókot (bukkális kapszulát). A hímek és nőtények (Melléklet 3-4. kép) könnyen megkülönböztethetők azáltal, hogy a hímek farki végén van egy jól látható párzótasak (bursa copulatrix, Melléklet 5-6. kép). Ez a tasak számos karaktert hordoz, ami a különböző fajok összehasonlításával talán adhat faji bélyegeket. Ezért a bursa copulatrix részeit röviden jellemzem. A hímvarszerv járulékos szervei a páros párzóhorog (spiculum, Melléklet 7. kép). A párzótasak a test végén levő bordákkal merevített lebeny, ami a párzást segíti (Melléklet 6. kép). A dorzális borda különösen jellegzetes, mivel ez a legnagyobb és 3 lebenyben végződik (Melléklet 8. kép). Ezen kívül a bordák mellett vannak gömbölyű végű tapogatók is (Melléklet 9-12. kép).

5.2. DNS szekvenciák

A vizsgálandó molekuláris markerek kiválasztása alapvető fontosságú volt a célkitűzéseim szempontjából. A korábbi publikációkban közölt *Dictyocaulus* férgek DNS szekvenciáival csak akkor tudom összevetni eredményeimet, ha ugyanazon molekuláris markereket alkalmazok. Illetve a több marker független vizsgálatával kapott filogenetikai eredmények összevetése a becsült evolúciós törzsfa megbízhatóságát teszteli, így segíti a tüdőférgek valós evolúciós viszonyainak becslését.

Munkám során 132 tüdőféregből (106 *Dictyocaulus* spp., 26 *Metastrongylus* spp.) és 6 egyéb parazita féreg egyedből (4 *E. cervi*, 2 *S. cervi*) sikerült DNS szekvenciákat meghatározni. A molekuláris vizsgálathoz felhasznált *Dictyocaulus* férgek 84 gazdaállatból származtak. A kétséges nukleotid pozíciókat mutató szekvenálási kromatogramokat eredményező szekvenciákat kizártam a további elemzésekből. Az újonnan kapott és filogenetikai, populációgenetikai elemzésekben felhasznált *cox1* és részben az ITS2 szekvencia adatok a GenBank adatbázisból elérhetőek a minta származásának adatainak feltüntetésével. Az egyes szekvenciák azonosítására szolgáló GenBank azonosító kódokat az 1. táblázat tartalmazza.

5.2.1. Nukleáris riboszomális gén intron 2 (ITS2)

A vizsgált tüdőféregek direkt szekvenálásainak tapasztalata alapján, igen gyakori volt az egyeden belüli ITS2 variabilitás, direkt szekvenálással csak ritkán sikerült teljes ITS2 szakasz nukleotid sorrendjét leolvasni. Öt *Dictyocaulus* tüdőféregből és kettő *Elaphostrongylus cervi*-ből sikerült teljes ITS2 konszenzus szekvenciát meghatározni PCR termék direkt szekvenálásával. A *Dictyocaulus* ITS2 szekvenciák 479-538 bp hosszúságúak, az *E. cervi* ITS2 fragmentumok hossza 535 bp. A *Dictyocaulus* szekvenciákban tapasztalható különbségeket alapvetően két csoportba sorolhatjuk. Egyik típusú, mely gyakran fajon belüli variabilitást is adott, a mikroszatellit ismétlésekben tapasztalható különbségek. Ezek okozták a szekvencia összerendezésekben látható hosszabb hiátusokat (gap). Conole és mtsai (2001) részletesen foglalkoztak a Nematoda-k ITS2 fajon belüli variabilitásával. A másik csoportba tartoznak az egyes nukleotid szubsztitúciók okozta különbségek (SNP). A DNS szekvencia különbségek egy része abból adódik, hogy az

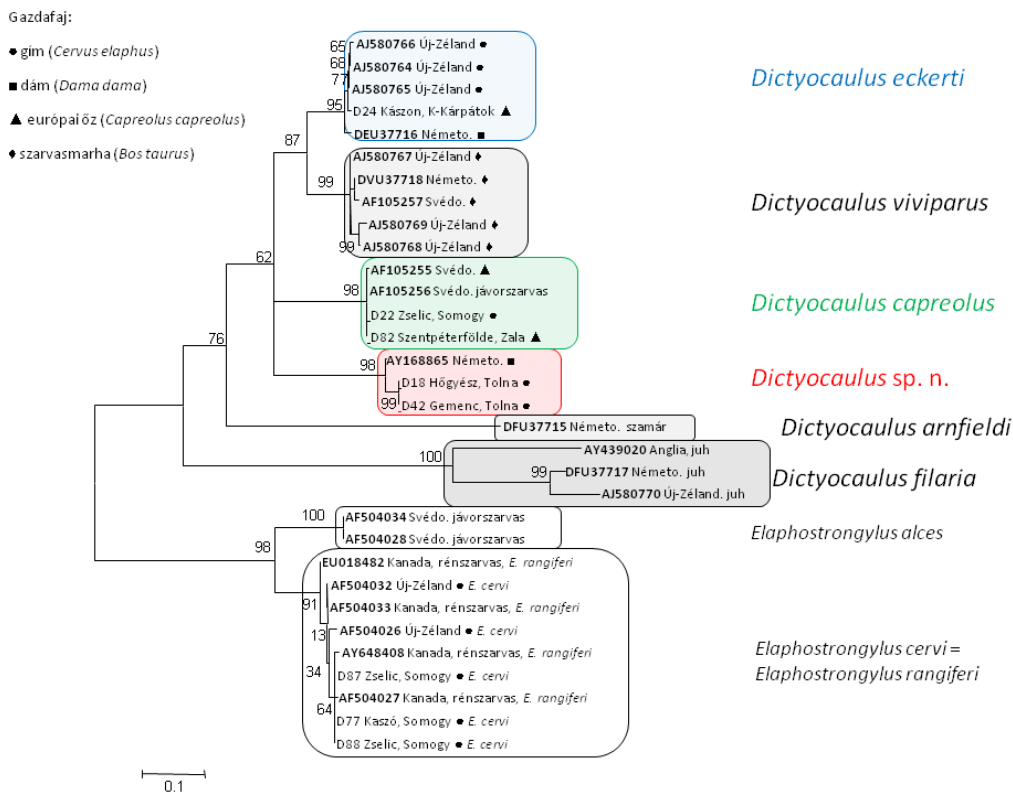
ITS2 szekvenciák összerendezésében viszonylag hosszú „gap”-ek alakulnak ki a mikroszatellit részek variabilitása miatt. Ezek a hosszú gap-ek torzítják a valós genetikai különbségeket, ugyanis a mikroszatellit egységek hiánya, vagy megléte nem egyenrangú a valós konzervatívabb nukleotid pozíciók szubsztitúciójával. A variábilis ITS2 szekvenciák Muscle algoritmussal való illesztése (MEGA6) 863 bp hosszú adatmátrixot eredményezett. A 3. ábra a ML módszerrel számolt ITS2 filogenetikai fát ábrázolja. Külcsoportként az *Elaphostrongylus* nem 3 fájának ITS2 szekvenciáit alkalmaztam. Magyarországi gímszarvasokból 2 *E. cervi* példány ITS2 nukleotid sorrendjét határoztam meg, 8 ITS2 szekvencia GenBank adatbázisból származott. A filogenetikai elemzésből kitűnik, hogy az *E. cervi* és *E. rangiferi* ITS2 szekvenciák nagymértékben hasonlóak, egy monofiletikus evolúciós vonalat mutatnak. Következésképpen a két fajnév nagy valószínűséggel szinonim, egy fajba sorolandók. Ezért az *E. cervi* és *E. rangiferi* parazita férgek gazdafaj szerinti faji megkülönböztetése indokolatlan.

Az ITS2 DNS szakasznak nincs kódoló funkciója. Ha a különböző fajokban a báziscserék (szubsztitúciók) random történnének, akkor a cserék purin bázisok közt, pirimidin bázisok közt, illetve purin-pirimidin cserék 25, 25 és 50 százalékban oszlanának meg. A vizsgált *Dictyocaulus* férgek közt azonban a purin-purin, pirimidin-pirimidin cserék jóval gyakoribbak, mint a purin-pirimidin szubsztitúciók. Ez a szubsztitúció megoszlás arra enged következtetni, hogy az átírt ITS2 régióknak lényeges másodlagos szerkezete van, ami szoros összefüggésben lehet funkciójával, azaz az RNS-sé való átírás utáni kivágódással.

ITS2 MOTU-k/klaszterek faji elnevezése.

A D24 azonosítószámú tüdőféreg ITS2 nukleotid sorrendje (GenBank id.: KT438070) 96%-os nukleotid egyezőséget mutatott az Epe és mtsai

(1997) által *D. eckerti* fajnak nevezett tüdőféreg ITS2 szekvenciájával (U37716). Az egy klasztert mutató D22 és D82 (KT438071) minták ITS2 szekvenciája 100%-ban megegyezett a *D. capreolus* faj típusegyed DNS szekvenciájával (AF105255, Höglund és mtsai, 1999), így e minták egyértelműen a *D. capreolus* fajba tartoznak. Egy harmadik MOTU/klaszterbe sorolt D18 és D42 minták ITS2 szekvenciája (D18 - KT438069) 95%-os nukleotid egyezőséget adott egy faji szinten nem ismert korábban közölt tüdőféreg mintával (AY168865, *D. sp.* P6A1, Höglund és mtsai, 2003). E 3 ITS2 szekvencia alkotta tüdőféreg csoport filogenetikai elkülönültsége hasonló mértékű (13%), mint a közel rokon filogenetikai egységeknek megfeleltethető *Dictyocaulus* fajok közti genetikai távolság, ezért faj szintű taxonként kezelhetjük az ITS2 filogenetikai fán jól elkülönült D18, D42 és P6A1 férgek szekvenciái által alkotott kládot is. A továbbiakban “*D. sp. n.*” név alatt szerepeltetem e molekuláris filogenetikai egységet. Az „sp. n.” a „species novum” rövidítése, mely a leíratlan faj léteire utal. A *D. sp.* P6A1 ITS2 szekvenciát dámszarvas tüdőféregéből nyerték, mely 3 egyedi nukleotid szubsztitúcióval (SNP) és egy négyszeres TATG mikroszatellit ismétlődésű inszercióval különbözött a hazai gímszarvasban élő két tüdőféreg szekvenciától (4. ábra). E kismértékű ITS2 szekvencia eltérés fajon belüli polimorfizmusnak tekinthető.



3. ábra. 32 ITS2 DNS szekvenciából (863 bp hosszú szekvencia illesztéssel) a Tamura-Nei model alapján számolt Maximum Likelihood filogenetikai törzsfa. Az elágazások megbízhatósági értékei 1000 bootstrap-ból számolt százalék értékek. A “*D. sp. n.*” elnevezés a D18, D42 és P6A1 férgek szekvenciái által alkotott molekuláris filogenetikai egységet jelöli.

| | | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 |
|--------------------|-----------|----------------|------------------|------------------|--------------------|-----|
| Translate | Consensus | TGTATGTATGTATG | ----- | ----- | ATATGTATTGATTATATA | |
| D42 ITS2 (1>508) | → | TGTATGTATGTATG | ----- | ----- | ATATGTATTGATTATATA | |
| D18 ITS2 (1>500) | → | TGTATGTATGTATG | ----- | ----- | ATATGTATTGATTATATA | |
| AY168865.1 (1>415) | → | TGTATGTATGTATG | TATGTATGTATGTATG | TATGTATGTATGTATG | ATATGTATTGATTATATA | |

4. ábra. A *D. sp. n.* MOTU-ba sorolt tüdőférgek ITS2 szekvenciáinak mikroszatellit (TATG) ismétlődési eltérése. A D18 ITS2 és D42 ITS2 szekvenciák magyarországi gímszarvasok, míg az AY168865 GenBank azonosító számú svédországi dām tüdőférgéből származott.

5.2.2. Mitokondriális citokróom c oxidáz 1 alegység gén (cox1)

Összesen 183 fereg cox1 fragmentumát szekvenáltattam, közvetlenül a tisztított PCR termékből. Teljes hosszában megszekvenált DNS sorrendet 150 mintából sikerült kapnom. A többi (33) mintából értékelhetetlen kromatogram görbéket kaptam. E szekvenálási görbékből arra következtettem, hogy a tisztított PCR termékben többféle cox1 fragment is volt, ami vélhetően arra utal, hogy a DNS tisztításkor a férgek testfelszínén idegen szövetdarabok is voltak, így nemcsak a tüdőférgesek DNS-t tisztítottam, hanem egyéb DNS molekulákat is. Valószínűleg a tüdőférgesek kutikula felszínére tapadt gazdaállat vérmintája szennyezhette a DNS mintákat. A cox1 primerek univerzális primerek, azaz számos állatcsoport mitokondriális cox1 génjéhez képes kötődni és PCR terméket adni. 9 minta cox1 szekvenciája a gazdaállat cox1 nukleotid sorrendjét adta, ami a GenBank adatbázis szekvenciáinak összehasonlításából derült ki. 8 minta gím (*C. elaphus*) és 1 minta dóm (*D. dama*) 660 bp hosszú cox1 szekvenciát adott, melyeket kizártam a további elemzésekből.

Minden egyes feregből származó cox1 PCR termék szekvenálása 657 bp volt, kivéve a *Setaria cervi* minták (D76, D261) cox1 fragmentumai, melyek 6 bp-ral, azaz 2 codon triplettel hosszabbak. Már a kezdeti filogenetikai elemzésekből kitűnt, hogy a *Setaria cervi* szekvenciák lényegesen eltérnek a *Dictyocaulus* és egyéb Strongylida rendbe tartozó külcsoport cox1 szekvenciáktól, ezért a filogenetikai analízisekből kivettem a *S. cervi* szekvenciákat. A nukleotid szekvencia adatokból aminosav sorrendet konvertáltam a gerinctelen állatok mitokondriális kodon táblázata alapján. Minden DNS szekvenciát ellenőriztem nyílt aminosav leolvasási keretre (Open Reading Frame, ORF), illetve hogy tartalmaz-e stop kodont, ami pseudogén jelenlétét mutathatta volna. Egyes mitokondriális gének másolatai átkerülhetnek a nukleáris genomba,

ami így funkció nélküli pszeudogént eredményez. Az univerzális primerek e nukleáris pszeudogénekhez is kapcsolódhatnak, ami „ál” szekvenciát, illetve hibás filogenetikai következtetés levonását eredményezhetett volna (Bensasson és mtsai, 2001). Vizsgálataim során ilyen pszeudogénre utaló szekvenciát nem találtam, tehát homológ szekvenciák kerültek összehasonlításra a filogenetikai elemzésekben.

Az új *cox1* szekvenciák a kodon triplet 3. bázispozíciójával kezdődtek. A *cox1* nukleotid sorrendek átkonvertálása során minden szekvencia 218 aminosavból állt. Mivel az analízisünkbe vont minden *cox1* szekvencia 657 bp nukleotid, ezért a szekvencia összerendezés egyértelmű adatmátrixot adott, minden nukleotid/aminosav pozíció egyértelműen homológ volt, ami a filogenetikai elemzés előfeltétele.

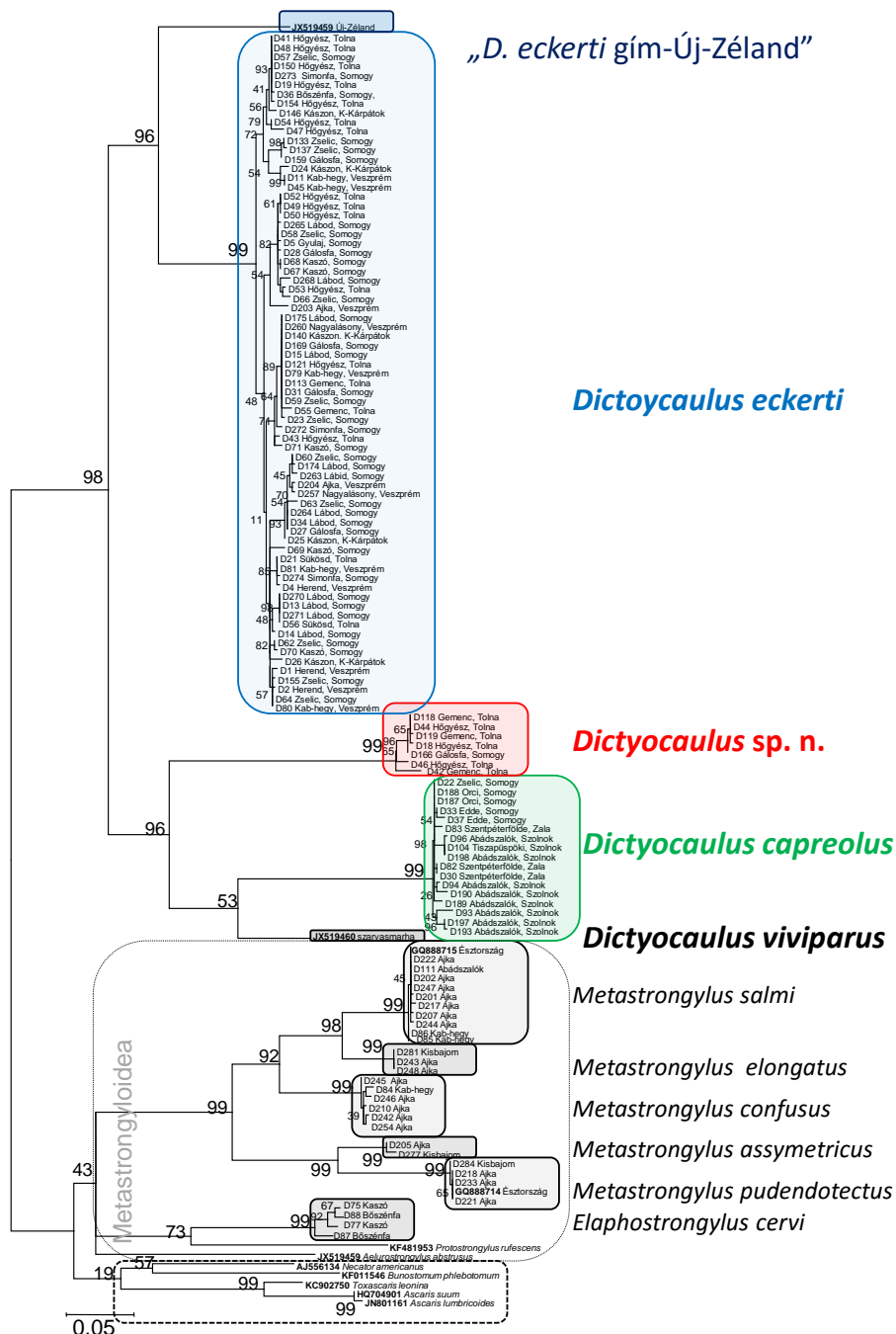
A *cox1* nukleotid adatmátrixba bevontam 136 saját szekvenciát (106 *Dictyocaulus*, 26 *Metastrongylus*, 4 *Elaphostrongylus*), és 11 GenBank-ból letöltött szekvenciát is (2 *Dictyocaulus*, 2 *Metastrongylus* és 7 egyéb *cox1* szekvencia), melyek a Strongylida rend képviselői. A *Dictyocaulus* és egyéb férgek *cox1* DNS szekvenciáiból álló adathalmazra a Tamura-Nei szubsztitúciós modell (TN93, Tamura és Nei, 1993) illeszkedett a legjobban, a nukleotidok báziscseréjét az adathalmazból gamma eloszlás (G) alapján becsülte a MEGA6 program, illetve figyelembe vette, hogy a nukleotid pozíciók egy része (I) invariáns (szubszt. modell jelölése: TN93+G+I). A mitokondriális genom, így a *cox1* gén is AT gazdag régió (átlagos GC tartalom 0,328%). A 2. kodon pozíciók GC tartalma 0,413%, míg a „lötyögő” 3. kodon pozíció GC tartalma 0,224%, ami kimondottan AT gazdag. Mindhárom kodon bázispozícióra külön-külön is készítettem filogenetikai fát, mivel eltérő az evolúciós rátájuk. A bázispozíciókra számolt filogenetikai fák egybevágóak voltak. A 2. kodon pozíció fája csupán a régmúlt evolúciós elágazásokat mutatta, míg a 3. kodon pozíció

fája a fiatalabb kapcsolatokra adott magasabb valószínűségi értékeket. A *cox1* aminosav szekvencia mátrixra a Jones-Taylor-Thornton (JTT) szubsztitúciós modell illeszkedett a legjobban 48 különböző modell közül (Modeltest), az aminosav cserék egyenlőtlenségével (G) és invariáns pozíciók (I) figyelembevételével (aminosav szubszt. modell rövidítése: JTT+G+I). A dolgozatban felhasznált *cox1* szekvenciák kezdő- és végpozíciójának meghatározását egy új-zélandi gímszarvasból származó *Dictyocaulus* teljes mitokondriális genomjának szekvenciájához való összehasonlításból végeztem (GenBank id.: JX519459, Gasser és mtsai, 2012). Ezen összehasonlítás alapján a dolgozatomban alkalmazott *cox1* fragmentumok kezdő- és végpozíciója 69-726 bp.

A *cox1* nukleotid és aminosav szekvenciákból számított NJ, MP, ML és MrBayes filogenetikai fák topológiája nagyon hasonlított, ami a *cox1* gén evolúciós múltjának jó becslését bizonyítja, ezért eltekinthetünk ezek részletes bemutatásától. Az 5. ábra a külcsoportokkal bővített tüdőféreg *cox1* DNS szekvenciákból számolt ML fát ábrázolja.

cox1 MOTU-k/klaszterek faji elnevezése.

A *cox1* ML fán jól elkülönült MOTU-kba/klaszterekbe csoportosulnak a féreg egyedek *cox1* szekvenciái. A *cox1* MOTU-k fajnévvel való elnevezését két módon tettem: (1) korábbi tanulmányokból ismert *cox1* szekvenciák nagymértékű hasonlósága alapján neveztem el adott MOTU-t, ha a fajnév használhatósága megalapozott, vagy (2) ugyanazon példányból származó ITS2 és *cox1* DNS szekvenciák esetén, az ITS2 MOTU fajneveit használtam azon *cox1* MOTU elnevezéséhez, ha a *cox1* MOTU-ba olyan példány tartozott, mely ITS2 szekvenciája alapján fajnévvel már elnevezhető volt. A továbbiakban a 18S rDNS, 28S rDNS és MSP1 MOTU-k elnevezéseit hasonló logika alapján kezeltem.



5. ábra. A cox1 DNS szekvenciákból számított Maximum Likelihood filogenetikai fa. Az ágak elágazásainál feltüntetett megbízhatósági értékek 1000 bootstrap %-t mutatják.

Szarvasfélék tüdőférgéből korábban csak az új-zélandi gímből ismert egy *cox1* szekvencia, ezért a hazai tüdőférgek *cox1* MOTU-jait az ITS2 és *cox1* MOTU-ba egyaránt tartozó egyedek alapján láthattam el fajnévvel (*D. eckerti*, *D. capreolus*, *D. sp. n.*). Az ITS2 MOTU/fajokhoz hasonlóan a hazai szarvasfélék *cox1* szekvenciái is 3 MOTU-ba osztottak (5. ábra). Az új-zélandi gímszarvas, és a svédországi szarvasmarha tüdőféreg *cox1* szekvenciák 2 elkülönült, egymintás (singleton) MOTU-ba tartoznak. A MOTU-k megbízhatósági (bootstrap) értékei meglehetősen magasak (99-100%), aminek alapján az említett *cox1* MOTU-kat filogenetikai fajoknak tekinthetjük. A *cox1* MOTU/filogenetikai fajok közti genetikai távolságokat a 6. táblázat listázza.

6. táblázat. Szarvasfélékben élő tüdőférgek és a közelrokon *D. viviparus* *cox1* MOTU-k/ filogenetikai fajok közti (interspecifikus) genetikai távolságok nukleotid polimorfizmus alapján.

| <i>Dictyocaulus</i> faj 1 | <i>Dictyocaulus</i> faj 2 | genetikai távolság (%)* |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| <i>D. viviparus</i> | <i>D. sp. gímszarvas</i> - Új-Zéland | 11,4 |
| <i>D. viviparus</i> | <i>D. sp. n. gímszarvas</i> | 13,2 |
| <i>D. sp. gímszarvas</i> – Új-Zéland | <i>D. sp. n. gímszarvas</i> | 14,6 |
| <i>D. viviparus</i> | <i>D. capreolus</i> | 10,7 |
| <i>D. sp. gímszarvas</i> - Új-Zéland | <i>D. capreolus</i> | 12,6 |
| <i>D. sp. n. gímszarvas</i> | <i>D. capreolus</i> | 12,6 |
| <i>D. viviparus</i> | <i>D. eckerti</i> | 12,8 |
| <i>D. sp. gímszarvas</i> - Új-Zéland | <i>D. eckerti</i> | 9,4 |
| <i>D. sp. n. gímszarvas</i> | <i>D. eckerti</i> | 13,8 |
| <i>D. capreolus</i> | <i>D. eckerti</i> | 13,4 |

* fajok közti átlagos bázis pozíciónkénti nukleotid különbség %-ban (p-távolság x 100)

Blouin (2002) szerint, ha közelrokon fonálférgek mitokondriális szekvencia különbözősége meghaladja a 10%-ot, akkor nagy valószínűséggel különböző fajokról van szó. Habár a "barcoding" tanulmányok nem javasolják a fajok megkülönböztetését DNS szekvencia különbözőségi küszöbértékekhez kötni, a Blouin féle 10% határérték igen

magasnak tűnik más állatcsoportok értékeihez mérten (2%: Hebert és mtsai, 2003, 2004), illetve tapasztalatok szerint jól alkalmazható fonálférgekre (Blouin, 1998, 2002; Mirinda és mtsai, 2008). A *D. viviparus* *cox1* szekvenciáktól jól elválnak a szarvasok tüdőférgeinek *cox1* szekvenciái (*cox1* MOTU-k közti genetikai távolság 10,7-14,6%). A vizsgálatunkba vont hazai szarvasfélékben élő *Dictyocaulus* fajok közti genetikai különbség (átlagos páronkénti nukleotid eltérés) 12,6-és 13,8% közötti, ami megközelítően tízszerese a fajon belüli genetikai variabilitásnak (0,8-1,8%, 7. Táblázat). Ezen értékek magas fokú genetikai izolációt igazolnak a vizsgált 3 szimpatikus elterjedésű tüdőféreg faj között, ami egyértelműen a különböző fajok genetikai elkülönülését bizonyítja. Az ITS2 elemzéshez hasonlóan a *cox1* analízisből is egyértelműen azonosítottam a leíratlan *Dictoycaulus* fajt (*D. sp. n.*).

7. táblázat. A magyarországi szarvasfélékben élősködő tüdőférgek *cox1* DNS szekvenciáinak fajon belüli genetikai diverzitásai.

| tüdőféreg faj | π (%)* | legnagyobb nukleotid eltérés fajon belüli egyedek közt (%) |
|----------------------------|------------|--|
| <i>D. capreolus</i> (n=17) | 0,86 | 2,0 |
| <i>D. eckerti</i> (n=79) | 1,84 | 4,0 |
| <i>D. sp. n.</i> (n=7) | 1,04 | 2,1 |

*: π = fajon belüli DNS szekvenciák közötti átlagos nukleotid különbségek bázispozícióként x 100)

A magas mintaszámú *D. eckerti* intraspecifikus diverzitása hasonló értéket mutat, mint más gerincesekben parazitáló fonálférgek, melyekben 2% alatti genetikai diverzitást mértek a mitokondriális DNS szekvenciák alapján (Blouin és mtsai, 1995, 1999; Blouin, 2002; Brashier és mtsai, 2004). A *D. capreolus* fajon belüli *cox1* diverzitása mintegy fele a *D. eckerti* fajénak (7. táblázat). Svédországi *D. viviparus* intraspecifikus mitokondriális diverzitási értékekkel való összehasonlításból elmondható,

hogy a szarvasmarha tüdőférges genetikailag közepesen diverz (lásd 5.5.2. fejelet, Höglund és mtsai, 2006; Hu és mtsai, 2002). Ehhez képest a hazai szarvasokban élő tüdőf férgek magasabb genetikai diverzitással rendelkeznek.

Az új-zélandi gímszarvasból származó *Dictyocaulus* *cox1* szekvencia (JX519459, Gasser és mtsai, 2012), melyet a teljes mitokondriális genom szekvenciából vágtam ki a filogenetikai elemzéshez, külön divergens vonalat mutat (5. ábra). Legközelebbi hasonlóságot a hazai *D. eckerti* *cox1* szekvenciákkal mutat. A magyarországi *D. eckerti* *cox1* szekvenciáktól számított átlagos *p* távolsága 0,094 (9,4%), ami közel van a Blouin-féle 10%-os genetikai határértékhez, és már faji különbséget feltételez. A szerzők *D. eckerti* fajnév alatt szerepeltették az új-zélandi nagy tüdőférges. Új-Zélandon a gímszarvas tenyésztés magas színvonalú és igen nagy egyedszámmal épül (Mason, 1994; Johnson és mtsai, 2004). Számos északi mérsékeltövi országból, túlnyomórészt azonban Skóciából, telepítettek gímszarvasokat Új-Zélandra, melyeket gyakran kereszteztek a tenyésztési céloknak megfelelően. Így a tüdőférges genotípus eredete egyelőre ismeretlen, származhat a skóciai gímekből, a kontinentális Európából, az észak-amerikai vapitiből, de akár más szarvas fajokból is.

A kulcsoportként analízisbe vont *Elaphostrongylus* és *Metastrongylus* férgekből származó *cox1* szekvenciák MOTU elemzése egyértelmű megfelelést mutatott a morfológiailag meghatározott fajoknak. Eszerint az *Elaphostrongylus cervi*, és 5 *Metastrongylus* faj küllemi faji elkülönítő bélyege genetikai izolációt is mutat. A *Metastrongylus* fajok közti genetikai távolsága *cox1* szekvenciák nukleotid eltérése alapján 6,1-12,9% közötti (8. táblázat). A *Dictyocaulus* fajok interspecifikus különbsége (9,4-14,6%) meghaladja a morfológiailag is jól elkülöníthető *Metastrongylus* fajok közti genetikai különbségeket, ami ismét

alátámasztja a *Dictyocaulus* fajok, és különösen a ”*D. sp. n.*” és ”*D. sp. gímszarvas – Új-Zéland*” valóban faji szintű szeparációját.

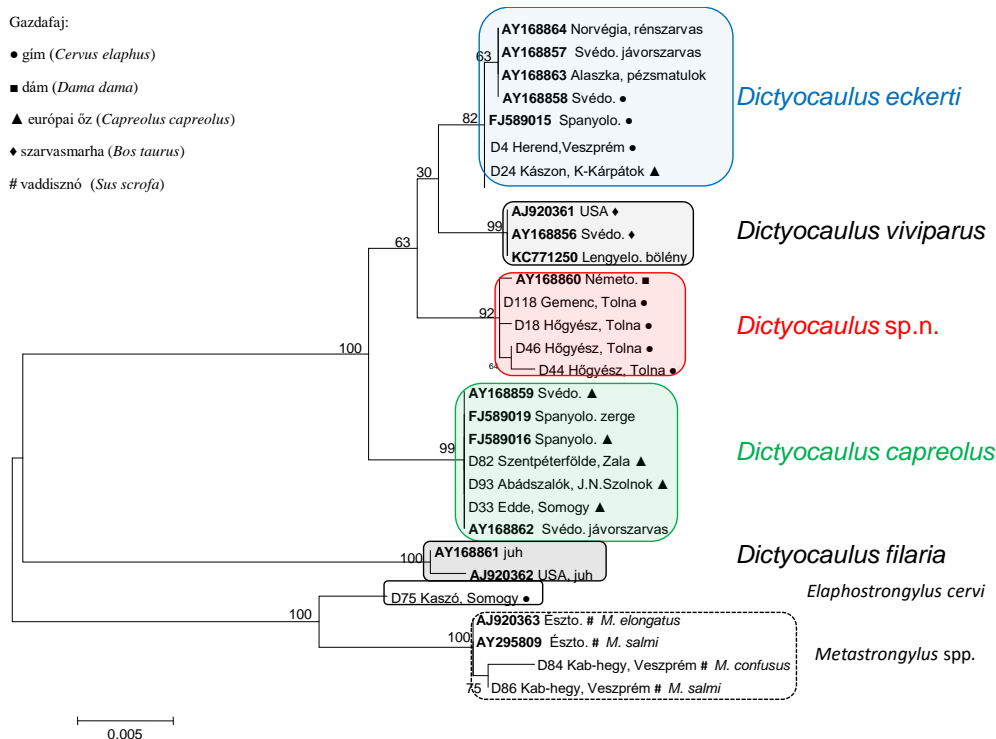
8. táblázat. Vaddisznókban élő *Metastrongylus* tüdőféreg fajok közti (interspecifikus) genetikai távolságok *cox1* nukleotid polimorfizmus alapján.

| Faj 1 | Faj 2 | genetikai távolság (%)* |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>M. pudendotectus</i> | <i>M. salmi</i> | 12,9 |
| <i>M. pudendotectus</i> | <i>M. asymmetricus</i> | 8,3 |
| <i>M. salmi</i> | <i>M. asymmetricus</i> | 11,3 |
| <i>M. pudendotectus</i> | <i>M. confusus</i> | 11,4 |
| <i>M. salmi</i> | <i>M. confusus</i> | 08,5 |
| <i>M. asymmetricus</i> | <i>M. confusus</i> | 10,4 |
| <i>M. pudendotectus</i> | <i>M. elongatus</i> | 11,1 |
| <i>M. salmi</i> | <i>M. elongatus</i> | 6,1 |
| <i>M. asymmetricus</i> | <i>M. elongatus</i> | 10,4 |
| <i>M. confusus</i> | <i>M. elongatus</i> | 8,1 |

* fajok közti átlagos bázis pozíciónkénti nukleotid különbség %-ban (p-távolság x 100)

5.2.3. Nukleáris riboszomális RNS kis alegység gén (18S rDNS)

Munkám során 9 *Dictyocaulus* példány, és külsoportként 1 *Elaphostrongylus cervi* és 2 *Metastrongylus* faj egy-egy példányának 18S rDNS szekvenciáját határoztam meg. A 18S rDNS szekvenciák hossza 1648-1690 bp közötti. A hosszú fragmentum ellenére is, csak kevés nukleotid polimorfizmust mutatott a szekvenciák illesztése. A saját és GenBank-ból letölthető *Dicytocaules* és két *Metastrongylus* 18S rDNS szekvenciákból álló illesztett mátrixra a HKY+G szubsztitúciós modell illeszkedett a legjobban AIC és BIC kritériumok szerint. E modell alapján futtatott ML fát mutatja a 6. ábra.



6. ábra. 18S rDNS szekvenciák alapján felállított Maximum Likelihood filogenetikai fa (HKY+G). Az ágak elágazásainál feltüntetett megbízhatósági értékek 1000 bootstrap %-át mutatják.

18S rDNS MOTU-k/klaszterek faji elnevezése.

Annak ellenére, hogy a riboszomális kis alegység konzervatív génhelyű, a DNS szekvenciákban is megmutatkoztak a faji különbségek. Az ITS2 és *cox1* MOTU-khoz hasonlóan a 18S rDNS elemzése is 3 MOTU-ba/filogenetikai fajba sorolta a hazai szarvasfélék tüdőférgzeit. A *D. eckerti* faj meglehetősen nagy földrajzi elterjedését és diverz gazdakörét bizonyítja az 6. ábrán látható törzsfá rekonstrukció. Norvégiai rénszarvasból, spanyolországi gímszarvasból, svédországi jávor-, és gímszarvasból, illetve jelen elemzés alapján magyarországi gímszarvasból és erdélyi őzből származó tüdőférgek egy MOTU-ba, a *D. eckerti* fajba sorolhatóak.

A svédországi őzből leírt *D. capreolus* 18S rDNS szekvenciájával 100%-os egyezőséget mutatott az e fajba sorolható összes fereg 18S rDNS szekvenciája. A *D. capreolus* 18S rDNS MOTU-ba sorolható tüdőféreg példányok földrajzi származása és gazdaállatai: magyarországi őzekből 3 tüdőféreg példány, spanyolországi őz és zergéből egy-egy példány, svédországi őzből és jávorszarvasból egy-egy példány.

Höglund és mtsai (2003) ugyancsak rávilágítottak egy ismeretlen faj jelenlétére az európai *Dictyocaulus* fajok filogenetikai elemzésekor (egyed azonosítója: P6A1). Ez a tüdőféreg példány azonban svédországi dámszarvasból származott, míg a hazai *D. sp. n.* férgek gímszarvasokból. A 18S rDNS filogenetikai elemzésemből egyértelmű, hogy a svédországi dámból és magyarországi gímből kimutatott ismeretlen fajú *Dictyocaulus* egyedek ugyanabba a fajba tartoznak. A *D. sp. n.* fajba sorolható 4 fereg egyed 18S rDNS szekvenciáját határoztam meg gímekből, melyek minimális bázis szubsztitúcióval 4 különböző 18S rDNS haplotípust mutattak. A szarvasmarhából és európai bölényből származó *D. viviparus* 18S rDNS szekvenciák közt nincs eltérés, míg a két juhból származó *D. filaria* példány némi különbözőséget mutatott.

A *Metastrongylus* fajok között jóval kisebb 18S rDNS szekvencia különbségek vannak, mint a *Dictyocaulus* fajok között. Ennek ellenére a *Metastrongylus* fajokon jól elkülönítő küllemi bélyegek alakultak ki, míg a genetikailag nagyobb mértékben elkülönült *Dictyocaulus* fajokra nem találtak küllemi, faji elkülönítő jellegeket (Divina és mtsai, 2000; Gassó és mtsai, 2014).

5.2.4. Nukleáris riboszomális RNS nagy alegység gén (28S rDNS)

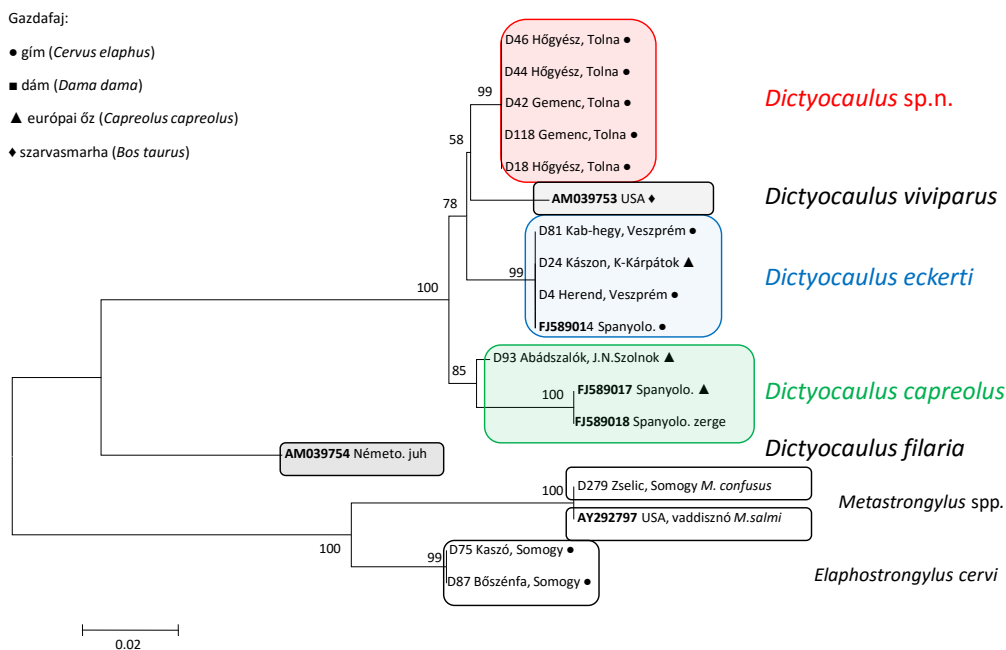
Spanyolországi szarvasfélék tüdőférgének 28S rDNS szekvenciái között lényeges különbségeket találtak Carreno és mtsai (2009). Ezért a

magyarországi szarvasfélék nagy tüdőférges közl kiválasztott egyedekre is elvégeztem a 28S rDNS D2-D3 régiójának nukleotid sorrend meghatározását és filogenetikai elemzését. Munkám során 9 *Dictyocaulus* egyedből, 1 *Metastrongylus* és 2 *E. cervi* egyedből határoztam meg a 28S D2-D3 régió DNS szekvenciáját (952-964 bp hossz). A magyarországi mintákon kívül az analízisbe vontam a GenBank-ból letöltetű 5 *Dictyocaulus* és 1 *Metastrongylus* 28S rDNS szekvenciát. A szekvenciák illesztéséből kiderült, hogy a spanyolországi őz és zerge szekvenciák egy igen hosszú (220 bp) delécióval rendelkeznek (vagy másképpen a magyarországi *D. capreolus* minták 220 bp inszercióval), mely a génről átíródó rRNS másodlagos szerkezetét is befolyásolhatja. A homológ nukleotid helyek elemzése érdekében a deléció/inszerció régiót kivágtam a szekvencia illesztésből, így 680 bp homológ szekvencia pozícióra végeztem el a filogenetikai elemzést. A különböző módszerekkel kapott filogenetikai fák hasonló topológiát eredményeztek. A 28S rDNS szekvenciákra a HKY+G modell illeszkedett a legjobban (AIC, BIC), mely alapján számított ML fát a 7. ábra mutatja.

28S rDNS MOTU-k/klaszterek faji elnevezése.

Az előző filogenetikai analízisekhez (ITS2, *cox1*, 18S rDNS) hasonlóan a szarvasfélékből származó hazai tüdőféreg mintákat is 3 MOTU-ba sorolta a 28S rDNS szekvenciák analízise. A spanyolországi gímből származó tüdőféreg szekvenciával 100%-ban megegyeztek a hazai *D. eckerti* minták szekvenciái. A 18S rDNS elemzésben szereplő *D. capreolus*-ba sorolt egyedek 18S rDNS szekvenciái teljes mértékben megegyeztek. Ugyanezen egyedek 28S szekvenciái azonban lényeges eltérést mutattak. A spanyolországi zergéből és őzből származó tüdőférges a deléciós régió kívül további egyedi nukleotid eltérésekben (2,1%) is különböztek a magyarországi őz tüdőférgestől. A D93 egyed ITS2, *cox1* filogenetikai

faj azonosításából következően a D93 egyedet tartalmazó 28S MOTU is *D. capreolus*-nak nevezhető.

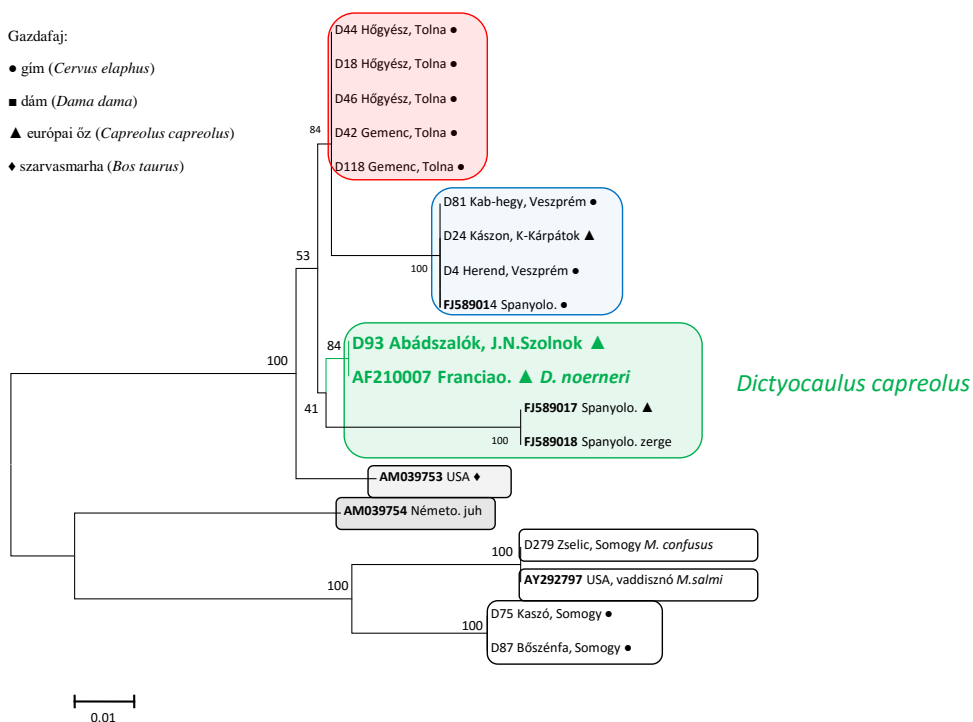


7. ábra. Inszerációs régiót nem tartalmazó 28S rDNS D2-D3 régió 680 bp illesztett szekvenciáiból számított Maximum Likelihood filogenetikai fa. Az ágak elágazásainál feltüntetett megbízhatósági értékek 1000 bootstrap %-át mutatják.

A *D. sp. n.* 5 magyarországi egyedéből származó 28S rDNS szekvencia nem mutatott változékonyságot. Két *Metastrongylus*-ból származó szekvencia teljes, 100%-os egyezőséget adott, holott bizonyos, hogy két külön fajba tartoznak (magyarországi *M. confusus* és USA-ból származó *M. salmi*).

Gouy de Bellocq és mtsai (2001) *D. noeneri* fajnév alatt közölt egy 278 bp hosszú 28S rDNS szekvenciát. E rövid 28S rDNS szekvencia szakaszra végzett NJ filogenetikai elemzésem szerint a *D. noeneri*-nek nevezett példány 28S rDNS szekvenciája 100%-ban egyezett a

magyarországi D93 minta, *D. capreolus* nukleotid sorrenddel (8. ábra). A franciaországi és magyarországi őzből származó tüdőféreg szekvencia teljes egyezősége, azaz faji azonossága egy lényeges taxonómiai problémára ad választ. A *Dictyocaulus noeneri* Raillet & Henry, 1907 fajt Durette-Desset és mtsai (1988) újra leírták franciaországi őzből, és javasolták az európai vadon élő szarvasok nagy tüdőférgének nevéként használni. Azonban más taxonómusok szerint alkalmazhatatlan név, mivel a faji leírása hiányos (ld. 2.2.2 fejezet). A Gouy de Bellocq és mtsai, (2001) publikációjában Durette-Desset is társszerző volt, bizonyára a tanulmányban felhasznált tüdőféreg példány megfelelt a *D. noeneri* fajként való alkalmazásnak. Mint a faj 'redescriptor'-a, ő volt a legalkalmasabb szakértő a *D. noeneri* féregegyed azonosítására (Durette-Desset és mtsai, 1988). Ez a példány azonban megegyezik a magyarországi D93 példány szekvenciájával, a D93 példányból származó 18S rDNS és ITS2 szekvencia azonos a svédországi *D. capreolus* típuspéldányokból nyert szekvenciákkal. Következésképpen a *D. noeneri*-nek nevezett franciaországi őz tüdőféreg azonos a *D. capreolus* fajjal. Skrjabin (1954) a *D. noeneri* fajnevet az általa korábban leírt *D. eckerti* szinonimájának tekintette, illetve Durette-Desset és mtsai (1988) is azt gondolták, hogy a *D. eckerti* és *D. noeneri* egyazon faj. Skrjabin (1954), Durette-Desset és mtsai (1988) véleménye nem igazolódott, mert a filogenetikai eredményeim alapján a *D. noeneri* név a *D. capreolus* fajnévvel azonos. A *D. noeneri* fajnév hiányos leírása miatt a *D. capreolus* fajnevet kell használni.



8. ábra. Tüdőférgék 28S riboszomalis RNS gén D2-D3 régiójának, 278 bp hosszú illesztett DNS szekvenciáiból számított Neighbor-Joining filogenetikai fa. Az ágak elágazásainál feltüntetett megbízhatósági értékek 1000 bootstrap %-át mutatják. A zöld színnel jelölt *D. noeneri*-nek nevezett tüdőféreg példány szekvenciája 100%-ban egyezett a magyarországi *D. capreolus* (D93) nukleotid sorrendjével.

5.2.5. Sejtmagi „Major Sperm Protein 1” gén (MSP1)

Összesen 8 kiválasztott *Dictyocaulus* mintából kaptam teljes hosszúságban MSP1 DNS szekvenciákat (*D. eckerti* n=4, *D. capreolus* n=2, *D. sp. n.* n=2). Számos PCR próbálkozás ellenére a kulcsoportnak tervezett *Metastrongylus* férgekből nem sikerült MSP1 PCR fragmentumot nyerni. Valószínűleg a *Metastrongylus* férgek esetében a primer kötőhelyek annyira különböznek, hogy a szarvasmarha *Dictyocaulus* férgekre tervezett primerek (Höglund, és mtsai, 2008) nem képesek kapcsolódni hozzá. Höglund és mtsai (2008) munkájában 100 svédországi nagy tüdőféregből közölt MSP1 szekvenciát (*D. capreolus*

n=11, *D. eckerti* n=17, *D. viviparus* n=72). A szekvenciák többségében voltak kétséges nukleotid pozíciók (N). A hazai tüdőférgek szekvenciáival való összehasonlításhoz mindhárom fajból egy-egy olyan GenBank-ból elérhető MSP1 szekvenciát választottam, melyekben nem volt ismeretlen nukleotid. Kulcsoport szekvenciaként az *Oesophagostomum dentatum* parazita féreg 4 MSP1 szekvenciáját töltöttem le GenBank-ból, mely faj nem túl távoli evolúciós viszonyban áll a *Dictyocaulus* férgekkel (Höglung és mtsai, 2008).

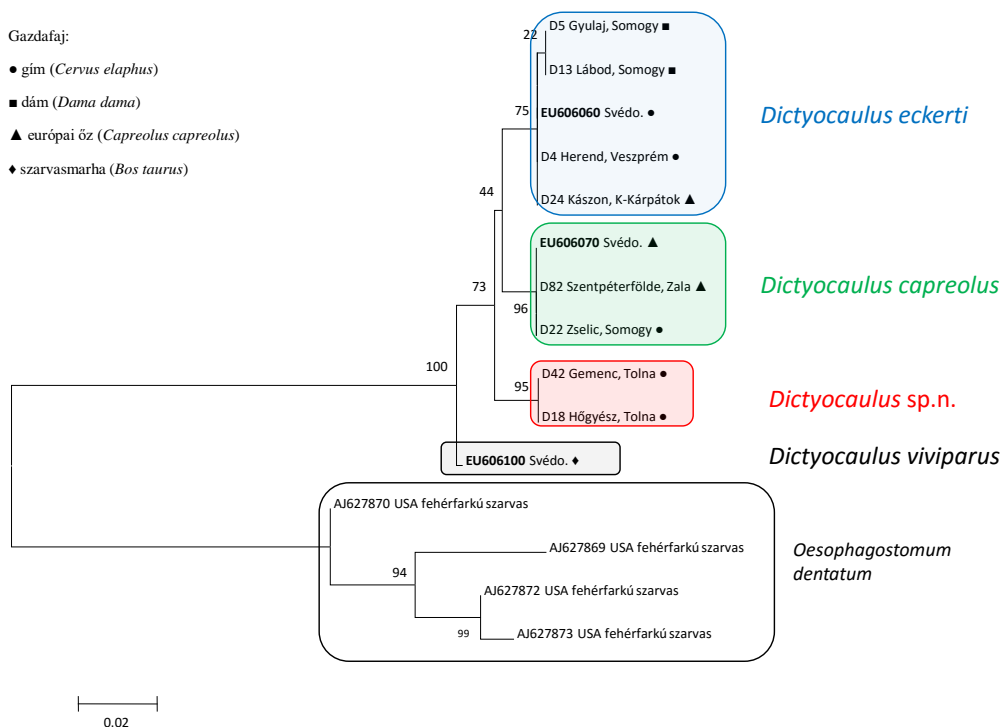
A hazai szarvasfélék tüdőférgének MSP1 fragmentumainak mindegyike 472 bp hosszúnak adódott. A PCR-hez alkalmazott MSP1 primerek által meghatározott DNS régió 2 exon között egy intron szakaszt is tartalmazott, majd a fragmentum vége ismét egy nemkódoló intron szakasz. A kezdő (forward) primer nem szaporítja fel az első exon kezdeti 2 aminosavat kódoló nukleotidjait, így az MSP1 gén kezdeti 6 bp-ja ismeretlen. Az MSP1 PCR fragmentum struktúráját a 9. ábra szemlélteti. Höglund és mtsai (2008) munkájából közölt *D. viviparus* MSP1 szekvenciák az intron régióban 6 bp-os inszerttel hosszabbak.

| | 472 bp hossz | | | |
|---|---|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| fw primer kötőhely 1-6. bp poz. 1-2. aa poz. | EXON I. | INTRON | EXON II. | nem kódoló |
| | 7-249. bp (243 bp hossz) | 250-311. bp (62 bp hossz) | 312-440. bp (129 bp hossz) | 441-478. bp (38 bp hossz) |
| | 3-83. aminosav pozíció (81 aa hossz) | | 84-124. aminosav (43 aa hossz) | |

9. ábra. A hazai szarvasfélék tüdőférgének Major Sperm Protein 1 gén szerkezeti felépítése (rövidítések: aa=aminosav, bp=bázispár).

A 15 MSP1 szekvencia (8 hazai *Dictyocaulus*, GenBank-ból 3 *Dictyocaulus* és 4 *Oesophagostomum dentatum*) illesztését Muscle kodon-algoritmus alapján végeztem. Az MSP1 szekvenciák illesztési mátrixa 478 bp hosszú, mely adatokra a Kimura-2 paraméteres

szubsztitúciós modell volt a legmegfelelőbb a báziscsere ráták gamma eloszlásával ($G=0,4178$). Az NJ, MP, ML filogenetikai fák topológiája teljes mértékben egyezett. A ML filogenetikai fát a 10. ábra mutatja.



10. ábra. 15 MSP1 DNS szekvencia Maximum Likelihood filogenetikai fája K2+G szubsztitúciós modell alapján. Az ágak elágazásainál feltüntetett megbízhatósági értékek 1000 bootstrap %-át mutatják.

MSP1 MOTU-k/klaszterek faji elnevezése.

A *Dictyocaulus* férgek MSP1 szekvenciái 4 MOTU-ra különültek el szignifikánsan (bootstrap értékek 75-96%). A *D. eckerti*, *D. capreolus* és *D. viviparus* MOTU-k fajnévvel való elnevezését Höglund és mtsai (2008) munkájában szereplő minták alapján tettem. *D. sp. n.* MOTU-t alkotó két minta (D18, D42) genetikai elkülönültségét az MSP1 génhely DNS szekvencia különbözősége is alátámasztja. *D. sp. n.* és *D. capreolus* MOTU-n/fajon belül nem volt nukleotid variabilitás. *D. eckerti* egyedek

közt minimális MSP1 szekvencia variabilitás volt tapasztalható. Az MSP1 szekvenciák illesztése 478 bp hosszú lett. A 478 nukleotid pozíció közül 74 volt variábilis, amiből csak 6 bp esett az exon régióba, 68 variábilis nukleotid helyet a változékony intron régió tartalmazott.

A *D. eckerti*, *D. capreolus*, *D. sp. n.* és *D. viviparus* MSP1 exonjaiból kovertált aminosav szekvencia (124 aminosav hossz) teljes mértékben egyezett, ezért az MSP1 protein nem mutat változékonyságot a vizsgált *Dictyocaulus* fajok közt. E felismerés gyakorlati jelentőségét az adja, hogy az MSP1 fehérjére, mint antigénre rekombináns vakcina előállítás kísérletek folytak (von Holtum, 2006), illetve szerológiai tesztet is alkalmaznak (Schnieder, 1993). Variabilitás hiányában az aminosav sorrendek filogenetikai elemzésének nem volt értelme.

5.3. Filogenetikai viszonyok

5.3.1. *Dictyocaulus* nem belüli, fajok közötti evolúció becslése

Multigénus módszerrel, azaz 5 lókuszon végeztem filogenetikai elemzést a hazai szarvasfélék nagy tüdőféreg mintáinak felhasználásával. A 4 sejtmagi és egy mitokondriális genomban elhelyezkedő lókusznukleotid polimorfizmusa különböző mértékű volt (9. táblázat), ami alkalmassá tette a szekvencia adatokat, hogy a közeli és régmúlt evolúciós kapcsolatokat is feltárhasson az elemzés. Az 5 lókuszon tapasztalt nagymértékű variabilitás különbségek miatt a filogenetikai elemzéseket lókuszonként külön végeztem. A lókuszos szekvenciáinak összevont filogenetikai elemzését csak az evolúciós ráták körülbelüli egyezősége indokolta volna, mely ez esetben nem állt fenn.

Az ITS2 szekvenciák filogenetikai elemzéséből kitűnt, hogy a hazai szarvasfélék nagy tüdőférgerei 3 különálló MOTU-ba, az elemzésem megközelítése szempontjából különböző filogenetikai fajokba sorolhatók.

A 3 MOTU közül kettő elnevezését korábbi tanulmányokban közölt ITS2 szekvenciák nagymértékű hasonlósága alapján végeztem (*D. eckerti* és *D. capreolus*). A harmadik MOTU genetikai távolsága az eddig ismert *Dictyocaulus* fajok közti genetikai távolsággal hasonló mértékű, és mivel az eddig leírt fajok DNS szekvenciáival nem mutat közeli hasonlóságot, ezért egy eddig leíratlan fajnak tekintettem. A 3 MOTU/faj genetikai elkülönültségét mind az 5 lókuszt filogenetikai elemzése egyhangúan kimutatta. A *Dictyocaulus* fajokat reprezentáló klaszterek elágazásainak megbízhatósági értékei igen magasak (bootstrap 70-100%), ami jelentős genetikai izolációt igazol a MOTU-k/fajok között.

9. táblázat. A filogenetikai elemzésekben felhasznált DNS szekvenciák, illesztett szekvencia mátrixok paraméterei, variabilitási mérőszámai.

| DNS régió | 18S rDNS | 28S rDNS | ITS2 | MSP1 | cox1 |
|---|---------------|--------------|--------------|----------|-----------|
| PCR fragment szekvencia hossz (bp) | 1648- 1690 | 964 | 479-538 | 472 | 657 |
| átlagos G+C tartalom | 0,46 | 0,426 | 0,297 | 0,504 | 0,328 |
| illesztett szekvencia mátrix hossz (bp) | 1682 | 680 | 863 | 478 | 657 |
| inszerció/deléciót tartalmazó poz.szám | 49 | 31 | | 103 | 0 |
| variábilis nukleotid pozíciók száma (bp) | 119 (7%) | 133 (24%) | 643 (75%) | 74 (15%) | 267 (41%) |
| illesztett szekvenciák száma (<i>Dictyocaulus</i> + külső csoport) | 24+5 | 14+4 | 21+11 | 11+4 | 106+39 |
| mutációk összes száma (η) | 122 | 149 | | 81 | 419 |
| nukleotid diverzitás (π) | 0,01467 | 0,06561 | | 0,07208 | 0,11038 |
| átl. nukleotid különbség (K) | 23,949 | 42,5817 | | 27,0286 | 72,5186 |
| nukleotid szubszt. modell | HKY+G | HKY+G | TN93+G | K2+G | TN93+G+I |
| aminosav szekvencia hossz | - | - | - | 124 | 218 |
| variábilis aminosav pozíciók száma | - | - | - | 0 | 54 (25%) |

A *Dictyocaulus* nemen belül a fajok filogenetikai kapcsolatait a fenti 5 lókuszra felállított törzsfá, gyakorlatilag 5 génfa, alapján becsültem. Egy génfa ugyan még nem biztos, de több génfa konzekvens törzsfája már jobban becsüli a valós evolúciós leszármazási kapcsolatokat. A különböző filogenetikai elemző módszerekkel (NJ, MP, ML, MrBayes) kapott ITS2 fa topológiák kissé eltérnek egymástól, így a *Dictyocaulus* fajok egymáshoz való viszonyát némiképp eltérően ábrázolják. Ennek ellenére mindegyik ITS2 fa konzekvensen monofiletikus eredetet becsül a *Dictyocaulus* nemre (3. ábra). Az elkülönített *Dictyocaulus* MOTU-k filogenetikailag erősen elkülönültek (bootstrap értékek 95% felett).

A nemen belül 3 filogenetikai evolúciós vonal különböztethető meg. A (1) *D. filaria* és (2) *D. arnfieldi* jelentősen eltér egymástól csakúgy, mint a (3) szarvasfélékben (Cervidae) és tülkösszarvúakban (Bovidae) parazitáló tüdőférgectől. A *D. arnfieldi* fajból csak egyetlen DNS szekvencia ismert, egy németországi számból származó példány ITS2 szekvenciája. Filogenetikai rokonsági viszonya csak ennek alapján becsülhető. Az ITS2 törzsfá szerint a nemen belül a *D. arnfieldi* jelentős genetikai elkülönülést, eltérő törzsfejlődési vonalat mutat a többi *Dictyocaulus* fajtól.

Az ITS2 szekvenciák illesztése sok pozícióban nem egyértelmű a mikroszatellit ismétlődések, deléciók, inszerciók miatt. Ezért az ITS2 filogenetikai fák alapján nem dönthető el a közelrokon *D. viviparus* – *D. eckerti* – *D. capreolus* – *D. sp. n.* fajok közti evolúciós kapcsolat. Az ITS2 ML filogenetikai fán feltüntetett MOTU-k/fajok közti elágazások megbízhatósági értékei nem túl magasak (bootstrap 62-87%). Tüdőférgcek ITS2 szekvenciái alapján Höglund és mtsai (2003) közöltek filogenetikai törzsfát, ahol a szarvasfélék és szarvasmarha tüdőférgceinek filogenetikai

kapcsolataira hasonlóan gyenge valószínűségi értékeket kaptak (bootstrap 55-69%).

Mivel a mitokondriális genom evolúciója jóval gyorsabb, mint a sejtmagi genomé, a mitokondriális *cox1* gén alapján felállított törzsfa az evolúciósan fiatalabb kapcsolatok felderítésére jobban alkalmazható, mint a bazális, régmúltbeli törzsfelődési viszonyokra (5. ábra). A *cox1* filogenetikai törzsfa nagymértékű genetikai elkülönülést mutat a végágak, azaz a *Dictyocaulus* MOTU-k/fajok között (a *Dictyocaulus* MOTU-k bootstrap értékei igen magasak, 99-100%). A *Dictyocaulus* nem egyértelműen monofiletikus (bootstrap 98%), és távoli rokonságot mutat az analízisben felhasznált egyéb parazita fonalférgekkel, ami család szintű taxonómiai rangját alátámasztja. A *cox1* szekvenciák filogenetikai elemzése csak a szarvasfélék és szarvasmarha tüdőfőfégének evolúciós kapcsolatait ábrázolja, mivel egyéb *Dictyocaulus* férgekből egyelőre nem ismert *cox1* szekvencia. A *cox1* szekvenciák alapján 5 *Dictyocaulus* faj különböztethető meg. A *Dictyocaulus* nemén belül az új-zélandi gímből származó genotípus legközelebbi rokonságot az európai *D. eckerti* fajjal mutat. A *D. viviparus* és *D. capreolus* közti 10,7%-os *cox1* szekvencia különbség miatt ugyan közel kerültek egymáshoz a filogenetikai törzsfán, azonban ennek a kapcsolatnak a megbízhatósági értéke csak 53%.

A sejtmagi genom riboszomális génjei közül a 18S rDNS szekvencia analízisét gyakran alkalmazzák magasabb rangú taxonok filogenetikai viszonyainak becslésére, mivel evolúciósan konzervatív génhely. A 18S rDNS filogenetikai analízist mutató 6. ábra is monofiletikus eredetet becsül a *Dictyocaulus* nemre. Nemen belül a *D. filaria* külön fejlődési vonalat mutat az analízis egyéb fajaitól (ITS2 filogenetikai analízishez hasonlóan). A 18S rDNS törzsfán látható fajok közötti azonos topológiát, illetve hasonló valószínűségi értékeket adott a 28S rDNS filogenetikai

törzsfák is (7. ábra). A 18S rDNS, 28S rDNS és ITS2 törzsfák egyértelműen bazális helyzetűnek becsülik a *D. capreolus* fajt (bootstrap 100-100%) a *D. eckerti* - *D. viviparus* - *D. sp. n.* fajcsoporthoz viszonyítva, ahogyan Höglund és mtsai (2003) eredménye is ezt mutatta. Ez utóbbi 3 faj evolúciós kapcsolata nem egyértelmű, mivel a fajok elágazásainak megbízhatósági értékei alacsonyak (bootstrap 63 és 30%). Az MSP1 DNS szekvencia alapú filogenetikai topológia viszont a *D. viviparus* fajt helyezi bazális pozícióba a *D. eckerti* - *D. capreolus* - *D. sp. n.* csoporthoz viszonyítva. Utóbbi 3 faj közötti filogenetikai kapcsolatokra az MSP1 filogenetika sem ad egyértelmű választ, mivel a fajok alkotta MOTU-k elágazásai alacsony megbízhatósági értékkel bírnak (44-73%). Az 5 gén törzsfáinak eredményeit összesítve, megállapítható, hogy a *D. capreolus*, *D. eckerti*, *D. viviparus*, *D. sp. n.* és '*D. sp. gím-Új-Zéland*' fajok közötti leszármazási viszonyokra nem kaptam egyértelmű eredményt. A *D. capreoulus* faj nagy valószínűséggel bazális helyzetű a többi faj alkotta klaszterhez.

5.3.2. *Dictyocaulus* nem magasabb rendű filogenetikai viszonyai

A mitokondriális szekvenciák ugyan kevésbé alkalmasak magasabb rangú taxonok filogenetikai kapcsolatainak kétséget kizáró felderítésére, ezek becslésére azonban használhatók. A *cox1* szekvenciák alapján felállított törzsfán a *Dictyocaulus* tüdőférgek legközelebbi evolúciós rokonai az *Aelurostrongylus*, *Elaphostrongylus*-*Parelaphostrongylus* és *Metastrongylus* fajok alkotta klád (*Metastrongyloidea*). E filogenetikai viszonyt alátámasztja az a parazita jellegzetességük, hogy az idesorolt férgek vagy kifejeletten kizárólag gerincesek tüdejében élősöknek (*Aelurostrongylus*, *Metastrongylus*) vagy tüdőben is előfordulnak a lárvavándorlásuk alatt (*Elaphostrongylus*, *Parelaphostrongylus*).

5.4. *Dictyocaulus* fajokat elkülönítő PCR alapú módszer

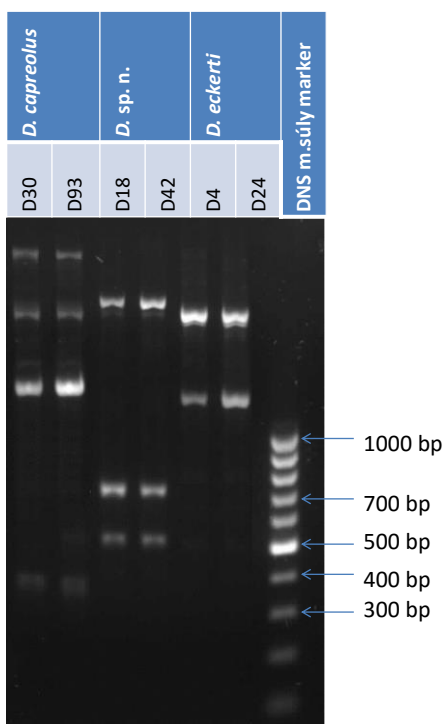
Dictyocaulus fereg fajokat elkülönítő módszerek eredményei és alkalmazhatóságuk.

- a) A *cox1* PCR fragmentumok olvadáspont analízise. A PCR fragmentumok nagy része különböző olvadási profilú, egyedi görbéket eredményezett. Az eljárással túl sokféle lefutású görbét kaptam, ezért alkalmatlan eljárásnak bizonyult a *cox1* haplotípusok fajoknak megfelelő csoportba való besorolására.
- b) Minimális PCR termék hossz különbségeket kaptam az ITS2 és 28S rDNS PCR termékek agaróz gélen való szétválasztása során. Azonban ezek a minimális különbségek nem megbízhatóak a gélfuttatás környezeti érzékenysége miatt, így faji különbségek detektálására sem.
- c) PCR-RFLP módszerrel próbáltam az MSP1, ITS2 PCR fragmentumokat elkülöníteni. Nem találtam azonban olyan restriktációs enzimet, mely konzekvensen *Dictyocaulus* fajra jellemző fragmentumhossz polimorfizmust adott volna. MSP1 PCR fragmentek 4 különböző enzim (TaqI, TruI, RsaI, SspI) restriktációs emésztésének gélképét a 2. melléklet mutatja.
- d) RAPD módszer alkalmazása a *Dictyocaulus* fajok elkülönítésére. A 12 különböző RAPD primer közül több primer is fajra jellemző sávmintázatot adott. A sávmintázatok hasonló intenzitású konzekvens ismételhetősége szempontjából viszont az OPB-01 primer bizonyult a legalkalmasabbnak a *Dictyocaulus* fajok identifikálására. A kiválasztott primer szekvenciáját, és a PCR kondíciókat az Anyag és módszer fejezet 4.3. pontja részletezi.

A hazai szarvasfélékben élősködő 3 *Dictyocaulus* faj elkülönítésére teszteltem RAPD primereket. A 106 *cox1* szekvencia alapján 3 fajba

sorolt tüdőférgeket 3 jól megkülönböztethető sávmintázattal tette láthatóvá az OPB-01 primer mind a 106 mintánál. A *Dictyocaulus* fajok OPB-01 primerrel való RAPD mintázatai élesen különböztek egymástól és más szarvasfélék tüdejéből előforduló *Elaphostrongylus cervi* és *Setaria cervi* férgek mintázataitól is. További 125 – faji szinten nem ismert *Dictyocaulus* – tüdőféreg DNS mintájára is elvégeztem a RAPD elemzéseket. A DNS szekvencia ismeret nélküli tüdőféreg példányok RAPD módszerrel történt faji azonosítását, mindig előzőleg ismert DNS szekvenciájú *Dictyocaulus* példányok kontrol DNS-ének sávmintázatával való hasonlóság alapján tettem. Mindhárom *Dictyocaulus* fajból (*D. capreolus*, *D. eckerti*, *D. sp. n.*) 2-2 példány kontrol DNS-ével együtt végeztem a RAPD PCR-ket és a gélfuttatásokat. Ezen DNS szekvencia nélküli RAPD mintázatok is konzekvensen 3 különböző sávmintázatot adtak, mely mintázatok megegyeztek az előző, faji szinten ismert tüdőféreg sávmintázataival (11. ábra.). Tehát a 3 *Dictyocaulus* fajra (*D. eckerti*, *D. capreolus*, *D. sp. n.*) jellemző RAPD mintázatot adott az összes eddig vizsgált magyarországi szarvasokban élő 231 tüdőféreg.

A RAPD PCR fragmentumok a teljes genom bármely részéről származhatnak, így adott genotípust is jellemezhet adott sávmintázat. Eredményeim alapján úgy tűnik, hogy az OPB-01 primer csak a 3 fajt megkülönböztető lókuszkra kapcsolódott, mivel mind a 231 tüdőféreg példány RAPD mintázata jól látható faji különbségeket mutatott. Az egyenlőtlen mintaszámok (*D. eckerti* n=79, *D. capreolus* n=17, *D. sp. n.* n=7) alapján való faj-azonosítás megbízható alátámasztásához további validálás szükséges nagyobb mintaszámmal.



11. ábra. Magyarországi szarvasokban előforduló *Dictyocaulus* tüdőféreg fajok RAPD sávmintázatai OPB-01 primerrel.

A RAPD módszer előnye, hogy gyors, egyszerű, olcsó molekuláris detektálási módszer. Divina és mtsai (2002) svédországi szarvasfélék és szarvasmarha tüdőférgének elkülönítésére ITS2 lókuszra specifikus hibridizációs eljárást dolgozott ki. E módszer azonban csak az akkor ismert tüdőféreg fajokat mutatta ki. Más fajokat, vagy az általuk ismert ITS2 szekvenciájú hibridizáló fragmenttel nem egyező genotípusú tüdőférgeseket, már nem mutathatta ki. A RAPD módszer nagy valószínűséggel kimutatja az eltérő fajú tüdőférgeseket is egy addig ismeretlen sávmintázat formájában. Hu és mtsai (2002) munkájában használt SSCP eljárással szemben is mutat több előnyt az általam javasolt RAPD módszer. A RAPD jóval egyszerűbb laboratóriumi felszereltséggel is elvégezhető, mint az SSCP analízis. Hu és mtsai (2002) munkája

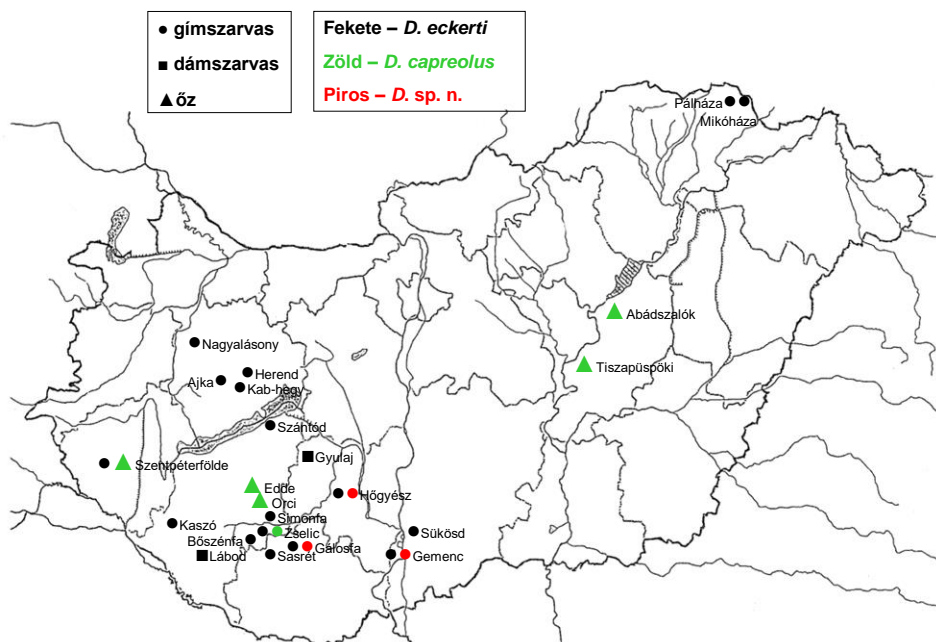
szerint a vizsgált 252 *D. viviparus* egyed *cox1* 3' végi fragmentje (393 bp) 46 különböző SSCP profilt adott, melyek (későbbi szekvenálás eredményeként) 12 különböző nukleotid sorrendű *cox1* haplotípusból származtak. Tehát a javasolt SSCP haplotípus/faj elkülönítő módszer sem DNS szekvencia specifikus, eltérő SSCP profilok is származhatnak ugyanazon haplotípusból.

A fenti eredmények alapján az OPB-01 primerrel való RAPD analízis alkalmasnak tűnik a *Dictyocaulus* fajok elkülönítésére, azonosítására, legalábbis a magyarországi tüdőférgek esetében.

5.5. Gazda-parazita kapcsolatok

A *cox1* DNS szekvencia analízis során 106 *Dictyocaulus* példány faji meghatározását végeztem el (1. táblázat, 12. ábra). További 125 nagy tüdőféreg példányt RAPD technikával azonosítottam faji szinten. A *cox1* és RAPD molekuláris markerekkel identifikált nagy tüdőféreg egyedek gazdafaja alapján vontam le következtetéseimet a hazai szarvasfélék gazda-parazita kapcsolataira vonatkozóan.

Összesen 184 tüdőféreg egyedet azonosítottam *D. eckerti* fajba sorolhatónak (79 példányt *cox1* alapján). Eredményeim alapján a magyarországi *D. eckerti* parazita elsődleges gazdafaja a gímszarvas (n=158). Sugár személyes közlése alapján dámszarvasokban jóval ritkábban találhatóak *Dictyocaulus* férgek, mint a gímekben. A vizsgálataimba vont tüdőférgek gazdaállata többnyire a gímszarvas volt (az összes gazdaállat 70%-a).



12. ábra. A fekete színnel jelölt *D. eckerti* tüdőféregfajt dámszarvasokban és gímszarvasokban azonosítottuk. A zöld színnel jelölt *D. capreolus* fajt őzekben találtuk Vas, Somogy és Jász-Nagykun-Szolnok megyében. A piros színnel jelölt, egyelőre ismeretlen *Dictyocaulus* faj gemenci, hőgyészi és zselici gímszarvasból származott.

A dámszarvasokból származó minden *Dictyocaulus* féreg *D. eckerti* fajhoz tartozott (n=13), ennek alapján a dámszarvas csak másodlagos gazdafaja a *D. eckerti* parazitának, legalábbis Magyarországon. A Keleti-Kárpátokban vizsgált egyetlen őzből származó valamennyi féreg *D. eckerti* fajnak bizonyult (n=13). Habár korábban már jelezték a *D. eckerti* fajt őz parazitájaként (Borgsteede és mtsai, 1990; Rehbein és mtsai, 2000), ezek az adatok azonban kizárólag kétséges morfológiai vizsgálatokon alapultak. Munkámban elsőként igazoltam molekuláris markerekkel a *C. capreolus* - *D. eckerti* gazda-parazita kapcsolatot.

A molekuláris markerrel 36 (17 példány *cox1* alapján) *D. capreolus*-nak azonosított féreg példányból 35 egyed származott magyarországi őzekből és csupán egy példány került elő gímszarvas tüdőből (D22, 1. táblázat). Ezért a *D. capreolus* férget az őz specialista parazitájának tekinthetjük, legalábbis Magyarországon. E parazita faj leírása szerint a típus gazdafaj az őz, Svédországban azonban jávorszarvasból is kimutatták (Divina és mtsai, 2000, 2002; Gibbons és Höglund, 2002; Höglund és mtsai, 2003). Munkám során kimutattam a *D. capreolus* tüdőférget gímszarvasból, ami új gazda-parazita kapcsolatot bizonyít. Eddigi eredményeinkből kitűnik, hogy a *D. capreolus* nagymértékben kötődik az őz gazdafajhoz. Így ennél a fajnál a gazdaspecifitás a fő előfordulási tényező. A *D. capreolus* előfordulása, elterjedése nem függ a különböző gyűjtőhelyek eltérő biotikus és abiotikus tényezőitől. Ezt a megállapítást az is alátámasztja, hogy az eltérő élőhelyű Svédországban, Törökországban és észak Spanyolországban egyaránt őzben találták ugyanezt a fajt (Carreno és mtsai, 2009; Divina és mtsai, 2000, 2002; Umur és mtsai, 2012).

A hógyészi és gemenci gímek többségében a *D. eckert* fajt mutattam ki, de néhány szarvasban egy ismeretlen tüdőféreg faj is előkerült. Magyarországi gyűjtőhelyei alapján a faj elterjedésének egyik limitáló tényezője lehet a vizes, ártéri élőhely. A *D. sp. n.* név alatt jelölt tüdőféreg faj egyedeit kizárólag gímszarvasból mutattam ki, ami szintén tudományra nézve új gazda-parazita kapcsolat. Összesen 8 féreg példány került elő e fajból a Dél-Dunántúlról. ITS2 DNS szekvencia elemzéseim alapján ugyanezt a leíratlan fajt mutatták ki Epe és mtsai (1997) németországi dámszarvasból. Divina és mtsai (2002) svédországi dámokból izoláltak 29 *Dictyocaulus* férget, melyek egyöntetűen azonos ITS2 hibridizációs profilt mutattak. A munkájukban alkalmazott 20 bp-os hibridizációs oligonukleotid 100%-ban egyezett a magyarországi *D. sp. n.*

ITS2 szekvenciával, és egyben különbözött más *Dictyocaulus* fajokétól. Tehát a leíratlan *Dictyocaulus* fajnak közép-, és észak-európai előfordulásai is ismertek és két gazdafaja: az európai dāmivad és a gímszarvas.

A korábbi, küllemi jellegek alapján meghatározott, tüdőféreg fajokat sokgazdás generalista parazita fajoknak tekintették (Sprehn, 1932; Eckert és mtsai, 1992; Kassai, 1999). A molekuláris markerekkel igazolt gazda-parazita kapcsolatok szerint azonban (Divina és mtsai, 2002; Höglund és mtsai, 2003; saját eredmények) csak a *D. eckerti* bizonyult sok gazdafajban élősködő, generalista fajnak. Kis mintaszámú vizsgálatok alapján más *Dictyocaulus* fajok csupán egy vagy néhány gazdafajban képesek megtelepedni (specialisták).

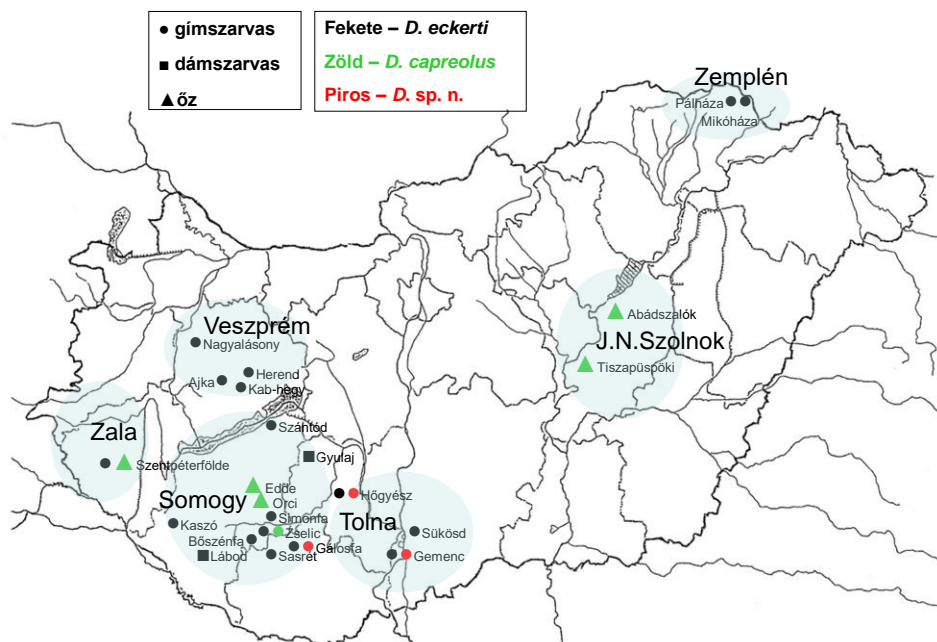
A gazda-parazita kapcsolatokat illetően a *D. eckerti* tüdőférget gyakori parazitának tartják vadonélő és félig háziasított szarvasfélékben (dám-, disznó-, gím-, indiai muntják-, jávor-, rén-, szikaszarvas, őz és vapiti). Azonban a tüdőférgek morfológiai és taxonómiai problémái miatt korántsem lehetünk biztosak a gazdafaj lista véglegességében és valódiságában. A diverz gazdaállatkör és nagy földrajzi elterjedés ismeretében még további gazdafajokra derülhet fény. Höglund és mtsai (2003) munkája szerint, a molekuláris markerekkel igazolt gazda-parazita kapcsolatokból következően a *D. eckerti* valódi generalista parazita faj (*D. eckerti* – gím-, jávor-, rénszarvas és pénzmatulok). Carreno és mtsai (2009) munkája alapján a potenciális rejtett szibling fajok tovább bonyolítják a *D. eckerti* gazda-parazita kapcsolatainak felderítését.

Munkámban nem vizsgáltam a *D. viviparus*-t, mint a szarvasmarha tüdőférgét. Korábbi tanulmányokból ismert, hogy hazánkban is gyakori volt a legeltetett szarvasmarha állományokban (Kassai és Holló, 1962). Hazánkban a vadonélő szarvasfélék, és szarvasmarhák gyakran legelnek

ugyanazon területeken. Potenciálisan lehetséges a szarvasok és szarvasmarhák tüdőférgének keresztfertőződése, gazdaváltása. Eddig azonban egyetlen *D. viviparus* tüdőférget sem találtam a vizsgált szarvasok tüdejében. Korábbi tanulmányok beszámoltak szarvasfélékben *D. viviparus* fertőzöttségről (Kutzer és mtsai, 1987; Sugár 1990, 1994), ezek az adatok azonban vélhetően hibás morfológiai határozásokból adódtak a kétséges morfológia határozókulcsok miatt (Divina és mtsai, 2000). Kétséget kizáró, molekuláris markerek alkalmazásával, nem mutattak ki *D. viviparus* előfordulást hazai szarvasfélékben. Magyarországon szarvasmarhákban a *D. viviparus* fajt mutatták ki morfológiai azonosítással (Kassai, 1989, 1999), bár külföldi szakirodalom a szarvasok tüdőférgéneként is említi (Bienioschek és mtsai, 1996). Eddig szarvasmarhákban kizárólag a *D. viviparus* fajt azonosították molekuláris markerekkel Ausztráliában (Gasser és mtsai, 2012), Németországban (Epe és mtsai, 1997) és Svédországban (Höglund és mtsai, 1999, 2003; Divina és mtsai, 2000).

5.6. Magyarországi szarvasok tüdőférgének populációgenetikája

A nagy tüdőférgék populációgenetikai vizsgálatát 106 *cox1* DNS szekvencia alapján végeztem. Ezek a szekvenciák 47 gazdaállatban élő *Dictyocaulus* féreg példányokból származnak. A gyűjtési helyeket illetve e helyek megyékbe való sorolását a 13. ábra mutatja.



13. ábra. A populációgenetikai elemzéshez felhasznált *Dictyocaulus* tüdőférgek gyűjtési helyei, megyei és gazdaállatai Magyarországon. A férgeket 2004. és 2015. között gyűjtöttük.

5.6.1. cox1 szekvencia elemzés

A *Dictyocaulus* férgek cox1 szekvenciái erősen AT gazdagok a nukleotid összetételüket illetően (66,3-70,1%, 10. táblázat), ami a parazita fonálférgekre általában jellemző (Blouin és mtsai, 1998). A populációgenetikai elemzésekhez felhasznált cox1 szekvenciák hasonlósági, filogenetikai viszonyait a 14. ábra mutatja. A cox1 szekvencia mátrixra legjobban illeszkedő szubsztitúciós modell az Akaike és Bayes információs kritériumok alapján a Hasegawa, Kishino és Yano (+G+I) modell, amit a Maximum Likelihood alapú filogenetikai elemzésben alkalmaztam. Az előző filogenetikai elemzésekhez hasonlóan a hazai szarvasfélék nagy tüdőférgei a 14. ábrán is 3 jól elkülönült MOTU-t mutatnak, melyek filogenetikai fajoknak felelnek meg. A közel

rokon *D. viviparus* cox1 szekvenciáktól ugyancsak jól elválnak a szarvasok tüdőféreg szekvenciái.

A cox1 filogenetikai törzsfa vizuális elemzéséből megállapítható, hogy a fajon belüli tüdőféreg klaszterek/csoportok nem mutatnak kapcsolatot sem lokális, sem regionális (megye) gyűjtőhelyekkel, sem gazdafajokkal (14. ábra).

D. eckerti volt a leggyakoribb a vizsgált tüdőféreg fajok között. A 79 *D. eckerti* cox1 szekvencia 20 magyarországi gyűjtőhelyről, 5 régióból (megye) származott (13. ábra), illetve egy keleti-kárpátoki gyűjtőhelyről. A vizsgált *D. eckerti* férgek 3 gazdafajból származtak. A filogenetikai fa szerint a *D. eckerti* férgeknek nincs gazdafaj szerinti genetikai strukturáltsága. Az egyes gazdafajok parazitáltsági megoszlását tükrözi a vizsgálatunkba vont cox1 szekvenciák mintaszáma is. Magyarországon a gímszarvas az elsődleges gazdája a *D. eckerti* parazita fajnak. Dámszarvasban ritkábban fordul elő, amit a mintaszám is tükröz. 32 gímszarvasból 68 féreg, 3 dámból 6 féreg és 1 őzből 5 *D. eckerti* cox1 szekvenciáját elemeztem. A 17 *D. capreolus* szekvencia 5 gyűjtőhelyet, és 3 régiót reprezentál. A *D. capreolus* 16 vizsgált példánya 10 őzből származott, ugyanakkor csak egyetlen férget azonosítottam gímszarvasból. A *D. sp. n.* név alatti faj 7 példánya kizárólag dél-dunántúli gímszarvasokból került elő, 3 gyűjtőhelyről és 2 megyéből.

Gazdafaj:

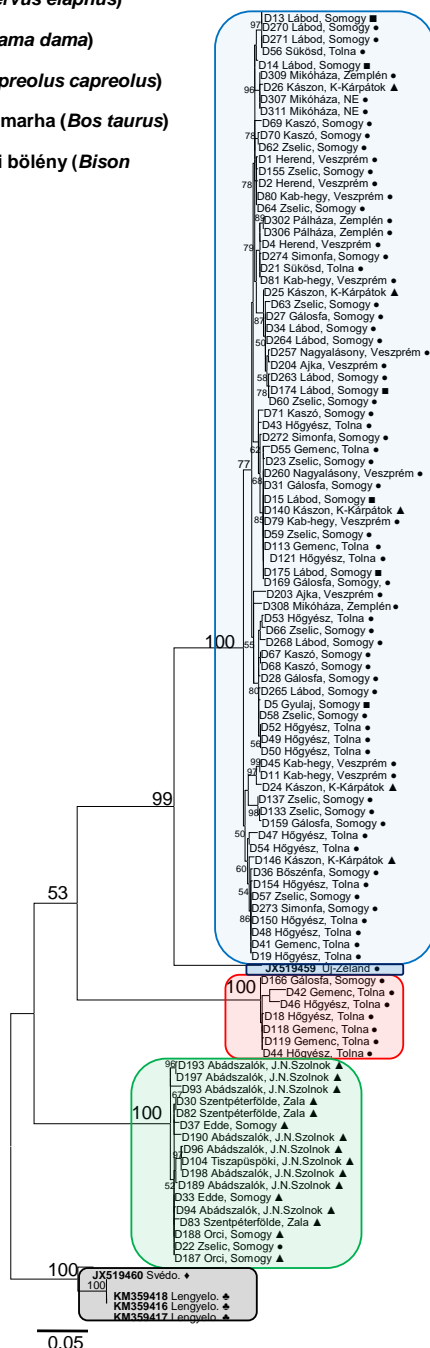
• gím (*Cervus elaphus*)

■ dām (*Dama dama*)

▲ őz (*Capreolus capreolus*)

♦ szarvasmarha (*Bos taurus*)

♣ európai bölény (*Bison bonasus*)



Dictyocaulus eckerti

„*D. eckerti* gím-Új-Zéland”

Dictyocaulus sp.n.

Dictyocaulus capreolus

Dictyocaulus viviparus

14. ábra. A populációgenetikai elemzésekben felhasznált cox1 DNS szekvenciákból számított Maximum Likelihood filogenetikai fa, gazdaállatok jelöléseivel.

5.6.2. Genetikai diverzitás

A hazai szarvasfélékben élő 3 *Dictyocaulus* fajra vonatkozó, fajon belüli genetikai diverzitási mutatókat a 10. táblázat mutatja (Hd , K , π).

10. táblázat. *Dictyocaulus* fajok genetikai diverzitás mérőszámai *cox1* szekvenciák alapján.

| parazita faj | gén | vizsg. bp | S % | G+C tart. | H/N | Hd | K | π | F_s | D | Referencia |
|---------------------|-------------|-----------|-----|-----------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|------------------------|
| <i>D. eckerti</i> | <i>cox1</i> | 657 | 14 | 0,337 | 51/79 | 0,974 | 12,08 | 0,0184 | -23,8* | -1,31* | saját |
| <i>D. capreolus</i> | <i>cox1</i> | 657 | 4,6 | 0,299 | 13/17 | 0,963 | 5,662 | 0,0086 | -4,48* | -1,47* | saját |
| <i>D. sp. n.</i> | <i>cox1</i> | 657 | 2,9 | 0,302 | 6/7 | 0,952 | 6,81 | 0,0104 | -0,53* | -0,93* | saját |
| <i>D. viviparus</i> | <i>cox1</i> | 393 | 3,8 | 0,31 | 12/252 | 0,766 | - | 0,0058 | - | - | Hu és mtsai, 2002. |
| | <i>cox3</i> | 375 | 4,5 | 0,265 | 7/72 | 0,73 | - | 0,013 | 5,66 | 1,12 | Höglund és mtsai, 2006 |
| | <i>nad5</i> | 395 | 5,8 | 0,315 | 10/72 | 0,85 | - | 0,014 | 3,38 | 0,43 | |
| | <i>rrnL</i> | 457 | 1,3 | 0,213 | 6/72 | 0,72 | - | 0,0039 | 1,58 | 0,54 | |
| | <i>trna</i> | 309 | 1,9 | 0,179 | 8/72 | 0,82 | - | 0,0058 | -0,29 | 0,60 | |
| | <i>cox3</i> | 1542 | 3,4 | 0,245 | 12/72 | 0,91 | - | 0,0090 | 10,9 | 0,79 | |
| | <i>nad5</i> | | | | | | | | | | |
| | <i>rrnL</i> | | | | | | | | | | |
| | <i>trna</i> | | | | | | | | | | |

S: variábilis bázis pozíciók száma %-ban, N: vizsgált szekvenciák száma, H: haplotípusok száma, Hd: haplotípus diverzitás, K: fajon belüli átlagos nukleotid különbségek száma, π : nukleotid diverzitás, F_s : Fu féle F_s statisztika, D: Tajima féle D statisztika, *: nem szignifikáns ($P>0.10$)

Az intraspecifikus átlagos nukleotid különbség (K) és az átlagos nukleotid diverzitás (π) a *D. eckerti* faj esetében ($\pi=0,018$) mintegy kétszerese a *D. capreolus* és *D. sp. n.* fajokénak. A *D. eckerti* populációinak átlagos nukleotid diverzitási értékei 0,0081 és 0,0239 között voltak (11. táblázat), jóval magasabbak a *D. capreolus* populációk értékeinél ($\pi=0,0027$ -0,0152). A *D. capreolus* teljes fajon belüli átlagos nukleotid diverzitása 0,0086. A haplotípus diverzitás (Hd) mindhárom faj esetében 1-hez közeli értéket mutat, ami nagyon diverz haplotípus eloszlást jelez. A *D. eckerti*, *D. capreolus* és *D. sp. n.* fajok haplotípusainak száma 51, 13, és 6. A tudóféreg *cox1* szekvenciák polimorf nukleotid pozícióinak aránya 2,9 és 14% közötti (14% a *D. eckerti* fajra vonatkozik). A legtöbb haplotípus

csak egyetlen példányban fordult elő. Az egyedi (singleton) haplotípusok száma 55, ami a 3 faj összes haplotípusainak 79%-a. A leggyakoribb *cox1* haplotípust (*D. eckerti* HP5) 10 példány hordozta, melyek 4 régióból származtak: Baranya, Somogy, Veszprém és K-Kárpátok.

5.6.3. Genetikai struktúra és génáramlás

A nagy tüdőférgesen populációgenetikai kutatásokat csak a svédországi szarvasmarha farmokon élő *D. viviparus* fajon végeztek (Hu és mtsai, 2002; Höglund és mtsai, 2004, 2006, 2008). A szarvasmarha tüdőférgek farmok közötti populációi között igen magas genetikai differenciáltságot találtak ($F_{ST}=0,7-0,8$), ami vélhetően emberi tevékenységek hatásaként jelentkezett. Ilyen magas fokú populáció strukturaltság kiugró a rokon trichostrongylida parazita férgek között. A populációgenetikai megközelítéssel vizsgált trichostrongylida fajoknál szinte kivétel nélkül alacsony populáció struktúrát találtak, nagy génáramlással és nagy genetikai diverzitással (Blouin és mtsai, 1992, 1995; Archie és Ezenwa, 2011; Gilabert és Wasmuth, 2013).

Munkám egyik kérdése, hogy a természetben előforduló *Dictyocaulus* férgek is erős populáció struktúrát mutatnak-e, mint a *D. viviparus*, vagy a trichostrongylidák többségéhez hasonlóan a gyenge strukturaltság jellemző. Populációgenetikai vizsgálataimat kis és közepes földrajzi léptékben, és a gazdafajok populációs szintjén elemeztem vadonéló szarvasfélék nagy tüdőférgesein. Populációgenetikai elemzéseket végeztem külön a 3 *Dictyocaulus* fajra, különböző vizsgálati szinteken. A gazdaegyed, lokális gyűjtőhely, megyei gyűjtőhely és gazdafaj szinten az *a priori* meghatározott populációkat a 11. táblázat listázza. Mivel a *D. sp. n.* fajt kevés minta reprezentálta, ezért a populációs elemzéseket a *D.*

eckerti és *D. capreolus* fajokra koncentráltam. A két faj eltérő populációgenetikai struktúrát mutatott.

11. táblázat. *Dictyocaulus* populációk *cox1* nukleotid variabilitási mérőszámai. A 3 *Dictyocaulus* faj populációinak felosztása gazdaegyed, gyűjtési hely, megye és gazdafaj szerint.

| parazita faj | populáció k felosztása | populáció | | H/N | S | Hd | K | π |
|--------------|------------------------------|------------------|---------------|-------|----|--------|--------|--------|
| D. eckerti | gazda egyed | G8 | | 2/3 | 14 | 0,6667 | 9,33 | 0,0142 |
| | | G11 | | 7/11 | 29 | 0,8909 | 11,13 | 0,0169 |
| | | G14 | | 4/4 | 18 | 1 | 10,00 | 0,0152 |
| | | G15 | | 5/5 | 34 | 1 | 15,7 | 0,0239 |
| | | G20 | | 2/3 | 16 | 0,6667 | 10,67 | 0,0162 |
| | | G38 | | 5/5 | 24 | 1 | 12,4 | 0,0189 |
| | | G45 | | 3/3 | 11 | 1 | 7,33 | 0,0112 |
| | | G71 | | 3/3 | 15 | 1 | 10,00 | 0,0152 |
| | | G74 | | 3/3 | 20 | 1 | 13,33 | 0,0203 |
| | helység | G84 | | 2/4 | 13 | 0,50 | 6,5 | 0,0099 |
| | | Herend | Veszprém | 3/3 | 8 | 1 | 5,33 | 0,0081 |
| | | Ajka - Kab-hegy | | 6/7 | 37 | 0,9524 | 14,57 | 0,0222 |
| | | Nagyalásony | | 2/2 | 14 | 1 | 14,00 | 0,0213 |
| | | Lábod | Somogy | 8/12 | 30 | 0,9240 | 10,17 | 0,0155 |
| | | Zselic - Gálosfa | | 15/17 | 39 | 0,9779 | 12,06 | 0,0183 |
| | | Bőszénfa-Simonfa | | 4/4 | 21 | 1 | 11,83 | 0,0183 |
| | | Kaszó | | 4/5 | 21 | 0,9 | 10,20 | 0,0155 |
| | | Högyész | Tolna | 8/12 | 29 | 0,9091 | 11,38 | 0,0173 |
| | | Gemenc – Sükösd | | 5/5 | 26 | 1 | 11,80 | 0,0180 |
| | | Pálháza-Mikóháza | Zemplén | 3/6 | 18 | 0,73 | 7,80 | 0,0119 |
| | Kászon | Kárpátok | 5/5 | 34 | 1 | 15,70 | 0,0239 | |
| | gazda faj | gímszarvas | | 44/68 | 87 | 0,977 | 12,10 | 0,0184 |
| | | dámszarvas | | 5/6 | 24 | 0,933 | 9,93 | 0,0151 |
| | | őz | | 5/5 | 34 | 1 | 15,7 | 0,0239 |
| | megye | Veszprém | | 10/12 | 41 | 0,9697 | 12,17 | 0,0185 |
| | | Somogy | | 28/38 | 58 | 0,9744 | 11,64 | 0,0181 |
| | | Tolna | | 12/18 | 39 | 0,9346 | 11,88 | 0,0181 |
| | | Zemplén | | 3/6 | 18 | 0,7333 | 7,80 | 0,0119 |
| | | Keleti-Kárpátok | | 5/5 | 34 | 1 | 15,70 | 0,0239 |
| D. capreolus | gazda egyed | G19 (W-HU) | | 2/3 | 4 | 0,6667 | 2,67 | 0,0041 |
| | | G50 (E-HU) | | 3/3 | 15 | 1 | 10,00 | 0,0152 |
| | helység | Szentpéterfölde | Zala | 2/3 | 4 | 0,6667 | 2,67 | 0,0041 |
| | | Abádszalók | J.-N.-Szolnok | 8/8 | 23 | 1 | 8,21 | 0,0125 |
| | | Edde | Somogy | 2/2 | 3 | 1 | 3,00 | 0,0046 |
| | | Orci | | 1/2 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | megye | Zala | | 2/3 | 4 | 0,6667 | 2,67 | 0,0041 |

| | | | | | | | |
|------------------|---------|---------------|-----|----|--------|------|--------|
| | | J.-N.-Szolnok | 8/9 | 23 | 0,9722 | 7,83 | 0,0119 |
| | | Somogy | 3/5 | 4 | 0,7 | 1,8 | 0,0027 |
| D. sp. n. | helység | Hőgyész | 3/3 | 11 | 1 | 7,33 | 0,0112 |
| | | Gemenc | 3/3 | 13 | 1 | 8,67 | 0,0132 |
| | | Gálosfa | 1 | - | - | - | - |

S: variábilis nukleotid pozíciók száma, *N*: analízisbe vont szekvenciák száma, *H*: haplotípusok száma, *Hd*: haplotípus diverzitás, *K*: nukleotid különbségek átlagos száma, π : nukleotid diverzitás

5.6.3.1. A földrajzilag elkülönített *Dictyocaulus* populációk genetikai strukturáltsága

A *D. eckerti* parazita faj magyarországi populációira csekély genetikai strukturáltságot kaptam, ami a fixációs indexek alacsony értékeiből becsülhető (12. táblázat). A populációk differenciáltságát becsülő F_{ST} , G_{ST} és N_{ST} paraméterek hasonló értékeket mutattak (0,034-0,050) minden vizsgált populációs szinten. Következésképpen a fixációs indexből számolt Nm érték magas, azaz jelentős a génáramlás az *a priori* definiált populációk között. A *D. eckerti* egyes megyei populációi között számolt páros differenciáltsági mutató értékek jelentős eltéréseket mutattak, $F_{ST}=0,0037-0,0598$ (13. táblázat). A legnagyobb genetikai differenciáltság a Veszprém és Zemplén megyei gímszarvasokban élő *D. eckerti* fereg populációk között volt. Figyelemre méltó, hogy nem a földrajzilag távoli K-Kárpátokban élő populáció mutatta a legnagyobb genetikai elkülönülést. A kárpáti őzből gyűjtött *D. eckerti* férgek haplotípusai filogenetikailag közeli rokonságot mutatnak a dunántúli *cox1* haplotípusokkal (14. ábra).

A *D. capreolus* populációgenetikai elemzését 17 *cox1* szekvencia alapján végeztem. A gazdaegyeden belüli, illetve a lokális populációk szintjén a genetikai differenciáltsági értékeknek kis jelentősége van, mivel alacsony a vizsgálható populációk mintaszáma. A regionális szinten elkülönített 3 *D. capreolus* populáció (J.-N.-Szolnok, Somogy, Zala megye) között számolt páros F_{ST} értékek igen hasonlóak (13. táblázat), azaz a 3

populáció közel egyenlően izolált egymástól. A *D. capreolus* fajon belüli, regionális (megyei) populáció közt számolt differenciáltsági mutatók 0,133-0,153 közöttiek (12. táblázat), ami közepes genetikai strukturáltságot becsül. A fixációs indexből számolt migrációs mutató ($Nm=3,27$) közepes génáramlást jelent.

12. táblázat. *Dictyocaulus* fajok populációs szintjeinek átlagos differenciáltsági és génáramlási mutatói egyes mitokondriális gének nukleotid polimorfizmusa alapján. A negatív értékek a populációk egyenlőtlen mintaszámából adódtak.

| parazita faj | pop.k felosztás a | gén | N | pop.-k száma | H | F_{ST} | G_{ST} | N_{ST} | Nm |
|----------------------------------|-------------------|------|-----|--------------|----|---------------|----------|----------|--------------|
| <i>D. eckerti</i> | megye | cox1 | 79 | 5 | 51 | 0,0425 | 0,0346 | 0,0423 | 11,27 |
| | helység | cox1 | 78 | 11 | 50 | 0,0445 | 0,0385 | 0,0443 | 10,74 |
| | gazda faj | cox1 | 79 | 3 | 51 | -0,0273 | 0,0280 | -0,0272 | 17,34 |
| | gazda egyed | cox1 | 40 | 9 | 27 | 0,0500 | 0,0365 | 0,0501 | 13,20 |
| <i>D. capreolus</i> | megye | cox1 | 17 | 3 | 13 | 0,1528 | 0,1328 | 0,1518 | 3,27 |
| <i>D. sp. n.</i> | megye | cox1 | 6 | 2 | 5 | -0,0909 | -0,0588 | -0,0900 | -9,00 |
| <i>D. viviparus</i> ¹ | állattelep | cox1 | 252 | 17 | 12 | 0,77 | 0,73 | 0,66 | - |
| <i>D. viviparus</i> ² | állattelep | cox3 | 72 | 9 | 7 | 0,70 | 0,72 | 0,70 | 0,10 |
| | | nad5 | 72 | 9 | 10 | 0,73 | 0,71 | 0,73 | 0,09 |
| | | rrnL | 72 | 9 | 6 | 0,80 | 0,80 | 0,80 | 0,06 |
| | | trna | 72 | 9 | 8 | 0,74 | 0,69 | 0,74 | 0,09 |

N: analízisbe vont szekvenciák száma, H: haplotípusok száma, F_{ST} : fixációs index, G_{ST} : populációk közti differenciáltság haplotípus diverzitás alapján, N_{ST} : populációk közti differenciáltság nukleotid diverzitás alapján, Nm : generációnkénti migráns egyedek száma,

¹ HU és mtsai, 2002, ² HÖGLUND és mtsai, 2006

A vizsgált *D. sp. n.* egyedeket két populációba soroltam, Somogy és Tolna “megyékbe”. A két populáció között alacsony differenciáltsági ($F_{ST}= -0,0909$), illetve magas migrációs értéket ($Nm= -9$) kaptam, ami magas fokú génáramlást jelez. Tehát a 3 gyűjtőhelyről származó *D. sp. n.* minták ugyanabból a populációból származnak. Azonban a kis mintaszám miatt ($n=7$) ezeket a populációgenetikai eredményeket csak fenntartással kezelhetjük.

13. táblázat. A *D. eckerti* és *D. capreolus* fajokon belüli, megye és gazdafaj szintű populációk közti páros differenciáltsági index (F_{ST}) értékek.

| faj | populációk felosztása | pop. 1 – pop. 2 | F_{ST} |
|---------------------|-----------------------|------------------------|----------|
| <i>D. eckerti</i> | megye | Veszprém – Tolna | 0,0584 |
| | | Veszprém – Somogy | -0,0037 |
| | | Veszprém – K-Kárpátok | -0,0284 |
| | | Veszprém – Zemplén | -0,0598 |
| | | Tolna – Somogy | 0,0073 |
| | | Tolna - K-Kárpátok | -0,0535 |
| | | Tolna – Zemplén | 0,0256 |
| | | Somogy - K-Kárpátok | 0,0204 |
| | | Somogy – Zemplén | 0,0048 |
| | | Zemplén - K-Kárpátok | -0,0336 |
| | gazda faj | gím – dám | 0,0026 |
| | | gím – őz | 0,0550 |
| | | dám – őz | 0,0199 |
| <i>D. capreolus</i> | megye | Somogy – Zala | 0,1625 |
| | | Somogy – J.-N.-Szolnok | 0,1500 |
| | | Zala – J.-N.-Szolnok | 0,1512 |

5.6.3.2. Gazdaegyedenkénti fűregpopulációk genetikai elkülönülése

A *D. eckerti* infrapopulációs genetikai elemzése szerint (12. táblázat) hasonló mértékű az egy-egy gazdaállatban élő tüdőfűreg egyedekből álló (infra)populációk genetikai elkülönülése ($F_{ST}=0,05$), mint a földrajzilag távoli (megyénkénti) populációk közti elkülönülés ($F_{ST}=0,0425$). Az infrapopulációk közti génáramlás igen nagy ($Nm=13.2$). Tehát az egy-egy gazdaállatban élő tüdőfűreg genetikai állománya nem különbözik lényegesen más gazdaegyedekben élő tüdőfűreg állományától, sőt, magyarországi viszonylatban más régiókban élő szarvasok tüdőfűreg állományaitól sem.

10 szarvas egyedből gyűjtött tüdőfűreg (infrapopuláció) *cox1* nukleotid diverzitásának figyelembevételével (11. táblázat), a gazdaegyedekben található tüdőfűreg genetikai diverzitásának átlaga ($\pi=0,01619$, $\sigma =0,004144$) nem különbözött szignifikánsan sem a különböző helységek fűreg populációinak genetikai diverzitás átlagától ($\pi= 0,0173$, $\sigma =$

0,004542), sem a megyénkénti populációk diverzitás átlagától ($\pi=0,0181$, $\sigma =0,00425$). Tehát a *D. eckerti* magyarországi állománya genetikailag homogén eloszlású. A homogén eloszlás viszonylag magas genetikai diverzitással párosul, mind a gazdaegyedekben élő infrapopulációk szintjén, mind a megyei (regionális) populációk szintjén.

5.6.3.3. Génáramlás gazdafaj szerint elkülönített populációk között

Genetikai struktúrát vizsgáltam a *D. eckerti* 3 gazdafaja (dám, gím, öz) szerint *a priori* elkülönített populációi között, ami a gazdafaj szerinti genetikai elkülönültséget teszteli. A fereg egyedek döntő többsége gímszarvasból származott, az őzből és dámszarvasból jóval kisebb számban vizsgáltam e parazitákat. Az eddigi *cox1* szekvenciák ML filogenetikai elemzéséből úgy tűnik, hogy a *D. eckerti* filogenetikai klaszterek/csoportok nem mutatnak kapcsolatot a gazdafajokkal (14. ábra). A különböző gazdafajok haplotípusai látszólag véletlenszerű eloszlást mutatnak a filogenetikai alklaszterek/csoportok között. A gazdafajok szerint *a priori* elkülönített populációk közti teljes fajra vonatkozó F_{ST} , G_{ST} és N_{ST} alacsony értékei szerint vélhetően elhanyagolható a genetikai differenciálódás (0,0272-0,0280) a gazdafajok szintjén. A gazdafaj szerint definiált populációk közt számolt páros F_{ST} értékek meglehetősen alacsonyak, illetve az átlagos migrációs mutató igen magas ($Nm=17,34$). Következésképpen a *D. eckerti* valószínűleg sokgazdás faj, haplotípusai nem, vagy csak kis mértékben kötődhetnek gazdafajokhoz.

5.6.4. Populáció történet

A populációnagyság múltbeli főbb eseményeinek genetikai nyomait szintén a *cox1* szekvenciák alapján elemeztem. A magyarországi szarvasokban élő mindhárom tündőfereg fajra negatív Tajima D és Fu F_s

értékeket kaptam. A negatív értékek a *D. eckerti* faj esetében erős eltérést jeleznek a természetes mutáció-genetikai sodródás egyensúlyi állapotól (10. táblázat). Ez az eltérés lehet természetes szelekció vagy demográfiai változás (populáció-méretváltozás) következménye. Az egyensúlyi állapotól való eltérés legnagyobb mértékét a F_u F_s érték jelezte, ami a legérzékenyebb mutató a múltbeli demográfia változás tesztjei közül. Ezért feltételezhető, hogy a múltbeli populációméret változásból származhat az eltérés a mutáció-drift egyensúlyi állapotól. A *D. capreolus* fajra kapott negatív Tajima D és F_u F_s értékek szintén demográfiai okokat valószínűsítene, ami lehet múltbeli populáció expanzió vagy az elterjedési terület növekedése. Az expanziós populáció modell szerinti 'mismatch' eloszlás mindkét fajra egycsúcsú, harang görbét eredményezett (15. ábra), ami populációnövekedési állapotot sugall mindkét vizsgált fajra. Ezt a megállapítást erősítik az alacsony 'raggedness' értékek: *D. eckerti* $r=0,0044$ és *D. capreolus* $r=0,0147$.

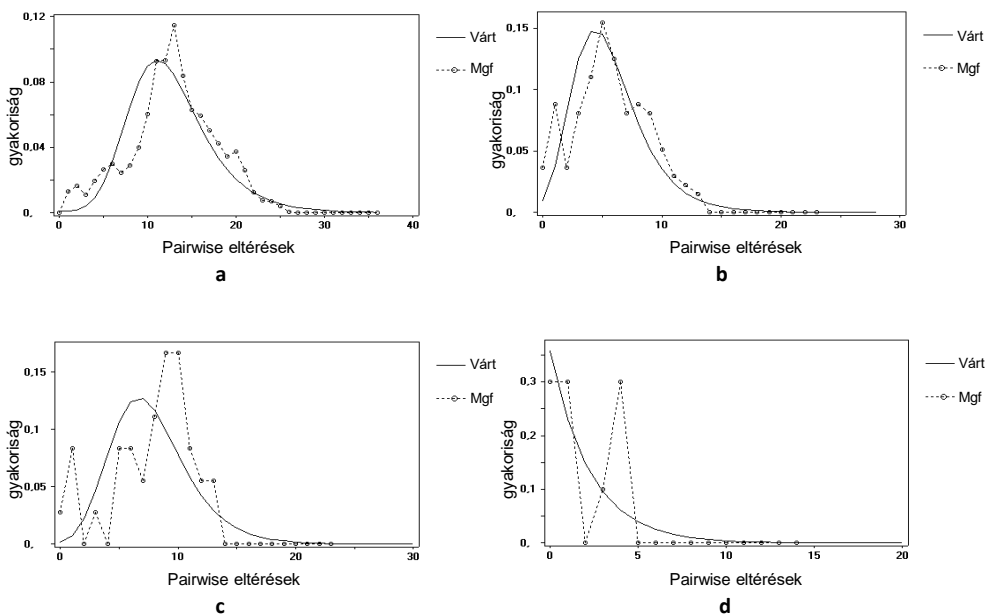
A DnaSP szoftver segítségével mindkét fajra, illetve a *D. capreolus* két populációjára futtattam 'mismatch' analízist a populáció expanzió kezdeti idejének becslésére. A tMRCA elemzés megadta azt a generáció számot (t), ami óta elkezdett a populáció nőni. A 'mismatch' görbe csúcseloszlásából (τ) számoltam a t -t. Li (1977) egyenlete alapján: $t = \tau / 2\mu$. μ a vizsgált gén mutációs rátája generációnként. μ -t a nukleotid pozíciónkénti, egy generációra vonatkoztatott mutációs ráta és a vizsgált fragment nukleotid számának szorzataként kaptam. Munkámban a *cox1* fragment hossza 657 bp. A nukleotid pozíciónkénti egy generációra és mitokondriális genomra vonatkozó mutációs rátához a *Chaenorhabditis elegans* értékét használtam: $1,57 \times 10^{-7} \pm 3,1 \times 10^{-8}$ (Denver és mtsai, 2000). Optimális körülmények közt 3-5 hét szükséges a *D. viviparus* egyedeknek a tojásból ivarérett kifejlett fereg állapot eléréséig (Kassai,

1999; Johnson és mtsai, 2004). Azonban a környezeti, és gazdaállathoz köthető faktorok késleltetik ezt a generációs időt, ezért átlagosan 4 generációra becsülhetem a szarvasfélék tüdőférgének évenkénti generációs számát. Az expandáló populáció generációs száma elosztva az évenkénti generációs számmal adja meg az évek számát, ami a populáció növekedésének kezdete óta eltelt.

A *D. eckerti* faj esetében a tMRCA analízist az összes *cox1* szekvenciája alapján végeztem, mivel az *a priori* felállított populációinak differenciálódását mutató elemzés szerint alig strukturált a magyarországi állomány, gyakorlatilag egy populációnak tekinthető. Így a *D. eckerti* 'mismatch' görbe unimodális eloszlási csúcsára kapott értékből számolva ($\tau=9,529$) a populáció expanziójának kezdete mintegy 46.000 generációval ezelőttre tehető, ami megközelítőleg 11.500 (9.600-14.400 CI) évnek felel meg, ha 4 generációval számolunk évenként.

Hasonló analízist végeztem a *D. capreolus* faj *cox1* szekvenciák egészére (15. ábra b), habár a populáció differenciáltsági mutatók közepes genetikai strukturáltságot jeleztek. A *D. capreolus* 'mismatch' eloszlásának unimodális görbe τ értéke 3,6689, ami a hazai teljes *D. capreolus* állomány expanziójának kezdetét ~4.500 évvel ezelőttre (3.700-5.500 CI) becsüli. Mivel a hazai 3 *D. capreolus* populáció közt közepes nagyságú genetikai struktúra mutatható ki, és az alföldi (J.-N.-Szolnok megye) és dunántúli (somogyi) minták között a populáción belüli genetikai diverzitás kb. négyszeres különbsége mutatkozott, ezért külön 'mismatch' elemzést futtattam a *D. capreolus* két populációjára. Az alföldi populáció negatív előjelű eltérést mutatott a neutralitási tesztekre (Tajima $D=-0,368$, Fu $F_s=-1,579$), illetve alacsony 'raggedness' értéket ($r=0,0363$). Ezek az értékek ugyancsak növekvő populációt jeleznek, amit az unimodális 'mismatch' eloszlási görbe is megerősít (15. ábra c). A

tMRCA analízis kalkulációja szerint az alföldi *D. capreolus* populáció expanziójának kezdete mintegy 7000 évvel ezelőttre tehető ($\tau=5,827$). A somogyi populáció Tajima D teszthe szintén negatív volt (Tajima $D=-0,4410$), viszont pozitív értéket adott a populáció demográfiai változásra érzékeny F_u tesztre ($F_u' F_s =0,469$) és viszonylag magas volt a 'raggedness' értéke ($r=0,23$). Ezen paraméterek szerint a somogyi populáció múltbeli mérete nagy átlagban konstans az alföldi növekvő populációval ellentétben. A somogyi *D. capreolus* mismatch eloszlásának görbéje multimodális (15. ábra d), ami múltbeli időszakos populáció méret csökkenésekre enged következtetni (palacknyak vagy angol elnevezéssel „bottleneck” hatás).



15. ábra. A *cox1* nukleotid polimorfizmusból számított megfigyelt (Mgf) és populáció expanziós modell alapján szimulált várt (Várt) mismatch gyakoriság eloszlás (a) *D. eckerti* magyarországi állományára, (b) *D. capreolus* magyarországi állományára, (c) *D. capreolus* alföldi populációjára és (d) a *D. capreolus* somogyi populációjára konstans populációméret modell alapján.

5.6.5. Populációgenetikai összefüggések

A tanulmányozott nagy tüdőféreg fajok földrajzi elterjedési területe jóval nagyobb, mint a jelen munka vizsgálati területe. A *D. capreolus* fajt Svédországból írták le (Gibbons és Höglund, 2002). Azóta Törökországból is publikálták elterjedését (Umur és mtsai, 2012). Minden bizonnyal a *D. capreolus* faj elterjedését közölték Spanyol-, és Franciaországból, habár nem *D. capreolus* fajnév alatt. Spanyolországban ibériai őzből *D. sp.2*, zergéből *D. sp.3* név alatt (Carreno és mtsai, 2009), míg franciaországi őzből *D. noerteri* néven (Durette-Desset és mtsai, 1988).

A *D. eckerti* faj földrajzi elterjedési területe igen nagy, gyakorlatilag az északi mérsékelt övre becsülhető a jelenlegi ismereteink szerint. A fajt Nyugat-Szibériából írták le (Skrjabin, 1931). Európában általánosan elterjedt (Epe és mtsai, 1997; Sugár, 1997; Höglund és mtsai, 2003) és Észak-Amerikában is él (Höglund és mtsai, 2003). Az új-zélandi “*D. eckerti* cf. red deer” (Gasser és mtsai, 2012) faji azonossága erősen megkérdőjelezhető az északi mérsékeltövi azonos néven ismert fajjal a *cox1* DNS szekvencia elemzéseiből következően (14. ábra). A formálisan leíratlan *D. sp. n.* faj elterjedési területének becslésére csupán néhány szórványos információ áll rendelkezésre. Munkám során a dél Dunántúlról mutattam ki 3 gyűjtőhelyről (Tolna: Hőgyész, Gemenc; Somogy: Gálosfa). A németországi dámban valószínűleg ugyanez a faj él (Epe és mtsai, 1997.), és valószínűleg a svédországi dámokból szintén ugyanezt a fajt mutatták ki (Divina és mtsai, 2002; Höglund és mtsai, 2003). Összességében elmondható, hogy a természetben előforduló tüdőféreg elterjedési területére egyelőre csak szórványos információkból következtethetünk.

A populációk térbeli genetikai strukturálódása evidens jelenség, ahol nem teljesen pánmiktikus a populáció. Háziállatok parazita fonálférgeinél gyakran kimutattak pánmiktikus populációkat, amiknek a haszonállatok, és egyben a parazita férgek transzportja lehet a fő oka (Blouin és mtsai, 1995; Archie és Ezenwa, 2011). Az F_{ST} , G_{ST} és N_{ST} differenciáltsági paraméterek kiváló mérőszámai a populációk strukturálódásának, fragmentálódásának. A *cox1* génhely differenciáltsági indexéből (F_{ST}) számolva, közvetve becsültem a populációk közti génáramlást (Nm). A génáramlás és differenciáltság közti elméleti összefüggést Wright (1951) egyenlete írja le: $Nm = (1 - C)/4F_{ST}$. Az egyenletből következően Nm értéke 1, ha $F_{ST}=0,2$. Elméletileg két populáció közt generációnként 1 bevándorló egyed hatására (1 effektív egyed, azaz részt vesz a következő generáció létrehozásában) kiegyenlítődik a két populáció csupán genetikai sodródásból adódó differenciálódása (Allendorf, 1983). Allendorf (1983) szerint az $F_{ST}=0,2$ küszöbértéket gyakran használják fajok/populációk jellemzésére: $F_{ST}<0,2$ értékű populációknak nagy a génáramlása és kevésbé strukturált a populációszerkezete, míg $F_{ST}>0,2$ gyenge génáramlást és erősen fragmentált populáció szerkezetet jelent. Hartl és Clark (1997) az $F_{ST}= 0,00 - 0,05$ kicsi; $0,05 - 0,15$ közepes; $0,15 - 0,25$ nagy; $0,25$ fölött nagyon nagy genetikai differenciáltság osztályozást javasolták. Mindkét felosztás szerint a *Dictyocaulus* fajok 3 különböző populációgenetikai osztályba sorolhatóak.

- (1) *D. eckerti* fajnak alacsony a populációk közötti differenciálódása ($F_{ST}\leq 0,044$), következésképpen magas a génáramlása (Nm). A *D. eckerti* populációi szoros genetikai kapcsolatot mutatnak (alacsony páros F_{ST} értékek, 13. táblázat). E parazita gazdaegyedei gyakran nagy távolságokra vándorolnak.

- (2) *D. capreolus* közepesen strukturált populációszerkezetet mutat a kis elemszámú vizsgálat alapján. Populációi között a differenciáltsági érték $F_{ST}=0,15$, ami a közepes és nagy kategóriák közötti, és közel van az Allendorf-féle 0,2 küszöbértékhez. A kritikus F_{ST} értékű fajok populációstruktúrája távolságfüggő eloszlást mutat. A *D. capreolus* esetében, a kis távolságra vándorló őz gazdafaj (territoriális viselkedés) okozhatja az észlelt populációstruktúrát.
- (3) *D. viviparus* extrémén fragmentált populációstruktúrát mutatott. F_{ST} értékei a nagyon nagy kategóriába esnek ($F_{ST}=0,66-0,80$). Ebből következően szinte elhanyagolható mértékű a génáramlás ($Nm=0,06-0,10$), aminek a szarvasmarha farmokon élő *D. viviparus* populációk közötti ritka tüdőféreg migráció lehet az oka. A vadon élő szarvasfélék nem gazdái a *D. viviparus*-nak (Höglund és mtsai, 1999; Gasser és mtsai, 2012), ezért a szarvasmarha telepeken szinte szigetszerűen élnek a *D. viviparus* populációk. A szarvasmarhákat gyakran szállítják a telepek között. Azonban a szigorú karantén szabályozásnak köszönhetően kicsi az esélye parazita immigrációnak, mivel az immigráns egyedeket parazita ellenes szerekkel kezelik, mielőtt a telepi állományhoz engedik. A telepeken előforduló haplotípusok elemzése alapján ritka esemény az eltérő haplotípusú parazita bejutása egy telepre. Ugyanakkor a többszörös parazita immigráció genetikai nyoma is kimutatható egyes telepeken (Höglund és mtsai, 2006).

Trichostrongylida fajok közül többnyire a háziállatokban élő férgek populációstruktúráit vizsgálták (Blouin és mtsai, 1991, 1992, 1995; Arcie és Ezenwa, 2011; Gilabert és Wasmuth, 2013), és csak kevés vadon élő parazita fajt. Az USA-ban fehérfarkú szarvas (*Odocoileus virginianus*)

tüdőférgét (*Mazamastrongylus odocoilei*) tanulmányozták Blouin és mtsai (1995). A magyarországi *D. capreolus* populációstruktúrához hasonlóan az észak amerikai *M. odocoilei* tüdőféreg populációk között közepes strukturáltságot ($N_{ST}=0,12$ és $0,31$) és nagy genetikai diverzitást mutattak ki ($\pi=0,019-0,037$). Az összehasonlítás megítéléshez meg kell említeni, hogy a *M. odocoilei* mintáit a magyarországi mintavételhez képest nagyobb távolságra fekvő helyekről gyűjtötték, és a mitokondrális NADH4 gén DNS szekvenciái (463 bp) alapján vizsgálták, mely génhely jóval variábilisabb a *cox1* génnél.

Számos tanulmány a paraziták populációgenetikai struktúráját a gazdafaj mozgékonyságának (eltérő mértékű területhasználatának) következményeként magyarázza (Levin és mtsai, 2013; McCoy és mtsai, 2003). Ez a megállapítás különösen igaz azon trichostrongylida fajokra, melyeknek fertőzőképes lárvája önmagától nem képes mozogni, nagyobb távolságra eljutni (Blouin és mtsai, 1995). A vizsgált két *Dictyocaulus* féregfaj gazdájának diszperziós mintázata között valóban lényeges különbség van. A *D. eckerti* gím- és dámszarvas gazdái nagyobb távolságra is képesek vándorolni (Kropil és mtsai, 2015), míg az őz csak rövidebb távolságra vándorol (Cagnacci és mtsai, 2011). Az őzek többnyire magányosan (bak) vagy kisebb csoportokban (suta és gida) élnek tavasztól ősziig, amikor a legvalószínűbb a tüdőféreg fertőzés veszélye. Az őznek két ökotípusát különböztethetjük meg Magyarországon: az erdei és mezei őzet. Ősztől tavaszig az erdei őz kisebb csoportokban (4-10 egyed), a mezei őz nagyobb egyedszámú csapatban él (néhány tucattól akár több száz egyedig). A mezei őzbakok márciusban válnak ki a csapatokból, a suták május közepén/végén, az ellést megelőzően. A gidák és fiatal suták további néhány hétig együtt maradhatnak. A téli csoportosulási időszakon kívül az őzek territoriális

életmódja miatt szegregált eloszlást mutatnak, ezért az őzek táplálkozása során történő véletlenszerű tüdőféreg lárvá felvételeket ritkább eseménynek várhatjuk. Ezzel szemben a gím és dámszarvas populációk inkább aggregált eloszlásúak, ami kedvezhet a gyakoribb parazita lárvá felvételnek, különösen gazda-csoporton belül nő meg a valószínűsége az újrafertőződésnek. Az állandó legelőn tartott szarvasmarhák esetében különösen nagy az esélye az újrafertőződésnek, ami (kedvező környezeti feltételek, párás időjárás fennállásakor) magyarázhatja a legelőn tartott szarvasmarha állományok erős dictyocaulosis járványait. Feltételezhetjük, hogy a tüdőféreg fertőzések nagy egyedszámú csapat egyedei között nagyobb valószínűséggel történnek meg (gímszarvas, mezei őz), mint a magányos vagy kis egyedszámú csapat egyedei között (erdei őz). Ez a feltevés összhangban van a tüdőféreg fertőzések prevalenciájával. A *Dictyocaulus* fertőzési prevalencia erdei őzben 8,3% míg mezei őzben 13%, illetve a legmagasabb érték gidakorban (33%) volt Sugár (1994) vizsgálata alapján. Igen nagy tüdőféreg fertőzési prevalenciát állapított meg Sugár (1997) gímszarvas borjakban (75%). A gímszarvas tehenek és borjak egész évben csapatosan (német szóval rudliban) élnek. Így a *Dictyocaulus* fajok populációgenetikai struktúráinak különbözősége a gazdafajok eltérő diszperziós viselkedésével magyarázható.

A *Dictyocaulus* nőstények számos tojást, utódot hoznak létre. Az utódok egy genetikai klasztert alkotva olyan területre terjedhetnek szét, ahova a gazdaállat eljut. A *D. eckerti* elsődleges gazdájaként a gímszarvasok, különösen a bikák, nagy távolságra is elvándorolhatnak (Kropil és mtsai, 2015). Magyarország területének kétharmadán él gímszarvas, és legnagyobb egyedsűrűségben a nagyobb számú mintával reprezentált Dél-Dunántúlon. A dámszarvas nem őshonos Magyarországon, de több helyre betelepítették elsősorban kerítéssel határolt kertekbe. Feltehetően

alacsony számú migráns lehet a foltszerű elterjedésű dóm populációk között, a gímpopulációk között viszont gyakori lehet a migráció. Mivel a dóm, gím és őz elterjedési területe jelentősen átfed, és jóval nagyobb, mint a munkámban mintázott terület, ezért szoros genetikai kapcsolat lehet a tüdőféreg (szub)populációk között, ami az egyes haplo/genotípusok gyors elterjedését lehetővé teszi.

Optimális körülmények között a *Dictyocaulus* férgeknek 3-5 hét szükséges, hogy a lerakott tojásból kifejllett féreg fejlődjön. A nyár második felétől megjelenő generációk nagy egyedszámú féregpopulációkat eredményezhetnek, melyek dictyocaulosis-t okozhatnak a gazdaállatokban. A férgek többsége elpusztul késő őszi a gazda immunválaszának, vagy a gazdaegyed elhullásának (ragadozó, betegség, vadászat) következtében. Általában csak néhány, esetleg csak hipobiotikus állapotban levő, féreg található télen a gazdaállatok tüdejében. Másrészt a 3. stádiumú lárvák áttelelhetnek a gazdaállaton kívül a talajban is, jóllehet csak néhány országban találták magasnak a talajban áttelelő férgek számát (Vercruysse és mtsai, 1998; Ploeger, 2002). Ebből következően csak kevés egyed telel át és alapítja a következő évi tüdőféreg generációt. Egy nőstény tavasztól-őszi viszonylag gyorsan igen nagyszámú utódot képes létrehozni, melyek alkalmas gazdában nagy egyedszámú csoportokat alkothatnak. Másrészt egy populáción belül, évről-évre gyakori lehet a "bottleneck" hatás, azaz szélsőségesen kis egyedszámúvá zsugorodik a populáció nagyság. A tüdőféreg életciklusát figyelembe véve nyilvánvaló, hogy egy új mutáció, vagy új haplotípus gyorsan elterjedhet a *D. eckerti* faj populációi között az erős génáramlásnak köszönhetően.

A *D. eckerti* és *D. capreolus* fajok populációdinamikai és evolúciós potenciálját befolyásoló hatásai is vannak a munkámban feltárt eltérő

génáramlásoknak (Barrett és mtsai, 2008). A többgazdás parazita, mint a *D. eckerti*, melynek úgy tűnik magas a gazdafajok közti génáramlási mutatója, gyakran válthatnak gazdafajt, ezáltal nem valószínű, hogy populációméretük extrém mértékben lecsökkenne (bottleneck). Ezzel ellentétben, az olyan egy gazdafajhoz kötődő paraziták, mint a *D. capreolus*, fragmentált populáció szerkezetük miatt a lokális populációiknál gyakrabban tapasztalható erős egyedszám csökkenés. Az európai őzön kívül a *D. capreolus* másik gazdafaja a jávorszarvas, legalábbis svédországi adatok szerint (Höglund és mtsai, 1999). A jávorszarvas diszperziós viselkedése jelentősen eltér az őzétől. A jávorszarvas gyakori vándorlása révén (Sweanor és Sandegren, 1989) nagy távolságra is elvihet különböző genotípusú *D. capreolus* parazitákat (migránsok), ezáltal jelentősen megnöveli a parazita faj génáramlását. A skandináviai őzek akár 500 km-t is vándorolnak ősszel délre a nagy hó és hideg miatt, majd tavasszal vissza. A svédországi *D. capreolus* populáció struktúrája valószínűleg kevésbé strukturált, mint a magyarországi őzállományokban élő fereg populációké.

Eredményeimből következően a *D. eckerti* populációjában (legalábbis a Magyarországon élőben) nem volt erős populációméret csökkenés az evolúciós közelmúltban. Továbbá az is megbecsülhető, hogy kb. 11.500 évvel ezelőtt kezdődhetett a populáció expanziója, egyedszám növekedéssel és/vagy elterjedési területnövekedéssel. Habár e mitokondriális DNS nukleotid polimorfizmusból következtethető időbecséseket befolyásolhatják egyes emberi beavatkozások, például a gyakori betelepítések (Morrison és Höglund, 2005). Becslésem szerint a *D. eckerti* populáció expanziójának hátterében a gazdafaj populáció növekedése állhat, mely a legutolsó jégkorszak után mehetett végbe. Ez egybevág az utolsó jégkorszak utáni felmelegedéssel, mely kb. 15.000

évvél ezelőtt kezdődött (Denton és mtsai, 2010). Skog és mtsai (2009) a *C. elaphus* faj eurázsiai elterjedésének kezdetét mintegy 300.000 évvel ezelőttre datálták, míg a gímszarvas európai expanziójának kezdetét Sommer és mtsai (2008) kb. 10.000 évvel ezelőttre becsülték. Skog és mtsai (2009) populációgenetikai elemzése alapján a gímszarvas Európában 3 földrajzilag elkülönülő populációra osztható: keleti, nyugati és mediterrán gím populációkra. A munkámban felhasznált gímszarvas minták kizárólag a keleti populációból származtak, mely populáció a Balkáni glaciális refúgiumból ered. A gímszarvasban élő tüdőférgesek szélesebb földrajzi régiókból származó mintáinak populációgenetikai elemzése várhatóan nagyobb differenciáltságot mutat, követve a gazdafaj populációinak fragmentáltságát. Bár az is elképzelhető, hogy a magyarországi struktúrához hasonlóan, kevésbé differenciált genetikai struktúrát mutatnak a nyugat- és észak-európai állományok is, mivel generalista parazita révén, több gazdafajban is megél.

Az expandáló populációkban, mint a *D. eckerti*, várhatóan ritka allélok jelenhetnek meg spontán mutációval, melyek stabilan fennmaradhatnak, illetve jelentős génáramlással viszonylag gyorsan elterjedhetnek. A *D. eckerti* jelenleg ismert gazdafajainak (gímszarvas, európai dāmavad, európai őz, jávorszarvas, pézsmatulok) igen nagy földrajzi elterjedési területük van, melyek nagy területeken átfednek. A nagy genetikai diverzitású, magas migrációs rátájú, tág gazdakörű *D. eckerti* parazita faj potenciálisan igen nagy elterjedési területen élhet, ezáltal az új mutációs allélok igen gyorsan terjedhetnek nagy távolságokra a populációi között és az egyes gazdafajokban egyaránt.

A magyarországi gímszarvasok többsége borjú korban átesik a *Dictyocaulus* fertőzöttségen (75% prevalencia, Sugár, 1990, 1997), illetve az idősebb gímszarvasokban is jelentős arányban található e parazita

(bikákban 36,4%, tehenekben 35% prevalencia, Sugár, 1997). A magyarországi őzgidákban 31-40% prevalenciájú a nagy tüdőféreg fertőzés (Sugár, 1997), illetve a gazdaegyenkénti átlagos intenzitás is kisebb őzekben, mint gímszarvasokban (Sugár, 1997; Sugár személyes közlése). Figyelembe véve a tüdőféreg fajok jelenleg ismert és potenciális elterjedési területét, gazdakörét, gazdafaj migrációs viselkedését, a parazitáltság prevalenciáját és intenzitását, a *D. capreolus* fajnak valószínűleg jóval kisebb az effektív populációmérete, mint a *D. eckerti* fajnak. Nagy egyedszámú *D. eckerti* populációkban a genetikai sodródás elhanyagolható mértékre becsülhető. A nagy populációméret magas genetikai diverzitással párosulva jó alkalmazkodó képességet biztosít a generalista *D. eckerti* parazitának különböző ökológiai, illetőleg szelekciós nyomásra, ami nagy evolúciós előnyt jelent.

Ezen új ismeretek a parazita fonalférgek elleni védekezésben is alkalmazhatóak, különösen annak ismeretében, hogy az anthelmintikumokkal szembeni rezisztencia gyors terjedését segíti elő a paraziták nagymértékű génáramlása (Kaplan, 2004).

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A disszertáció témájának evolúciós, ökológiai eredményein túl, állategészségügyi vonatkozásai is vannak, mivel a nagy tüdőférgek fontos paraziták a háziállatokban és egyes vadgazdálkodási szempontból fontos nagyvadfajokban.

A *Dictyocaulus* fajok molekuláris jellemzésére, elkülönítésére a kutatók többnyire a sejtmagi riboszomális ITS2 DNS szekvenciát használták. Az ITS2 nukleotid sorrend jelentős variabilitást mutat a fajok között. A szekvenciák illesztése azonban nem egyértelmű, ezért a haplotípusok/fajok közti különbségek, filogenetikai következtetések bizonytalanok. Gasser és mtsai (2012) a mitokondriális genom proteinkódoló gének (n=12) nukleotid sorrendjéből konvertált aminosav sorrendeket javasolták a tüdőférgek molekuláris azonosítására. Azonban költséges módszer lévén, nem várható a szélesebb körű alkalmazása. Eredményeim alapján, a mitokondriális citokróm c oxidáz 1 (cox1) gén 5' „barcoding” régió nukleotid sorrendje jól alkalmazható a *Dictyocaulus* fajok molekuláris azonosítására, jellemzésére, új fajok kimutatására, filogenetikai kapcsolatok becslésére, sőt populációgenetikai elemzésekhez is.

A *Dictyocaulus* fajok megbízható elkülönítésére a cox1 DNS szekvencia analízis javasolható. Az előzőleg ismert DNS szekvenciájú *Dictyocaulus* DNS minták kontrolként való összehasonlításával alkalmasnak tűnik a RAPD módszer is, hogy adott példány faji hovatartozását eldönthessük. Az ismert szekvenciájú férgek RAPD mintázataitól eltérő mintázatot mutató példányok faji azonosítása megbízhatóan csak DNS szekvenciák alapján lehetséges.

A *Dictyocaulus eckerti* fajnévről érdemes néhány szót említeni. Eredetileg Nyugat-Szibériából írta le Skrjabin (1931), mint a rénszarvas (*Rangifer tarandus*) nagy tüdőférgét. Majd Németországból származó dában élő *Dictyocaulus*-t nevezték ezen a néven Epe és mtsai (1997), illetve e minta ITS2 szekvenciáját hívják *D. eckerti*-nek, mint genetikai „voucher” haplotípust. Azonban nem biztos, hogy a szibériai rénszarvasban és a németországi dában ugyanazon *Dictyocaulus* faj él. A kérdés megoldása az volna, ha elvégeznék a nyugat szibériai rénszarvasból származó tüdőféreg DNS vizsgálatát és összevetnék az Epe által kinevezett *D. eckerti* DNS (ITS2) szekvenciájával.

A tüdőféreg gazda preferenciája nagy fontosságú e paraziták állategészségügyi relevanciája miatt. A *D. capreolus* gazda-fajlagosságát a gazdafaj határozza meg elsődlegesen. A *D. eckerti* és *D. sp. n.* tüdőféreg fajok gazdakör fajlagosságát, specializáltságát feltehetően más tényezők is befolyásolják. Munkámban kimutattam a *D. eckerti* és *D. sp. n.* szimpatrikus előfordulását ugyanazon gazdafajban (gímszarvas) több élőhelyen is (Gemenc, Hőgyész, Gálosfa). A *D. sp. n.* példányok gyűjtési adatai alapján nem találtam olyan ökológiai tényezőt, ami indokolhatná e parazita faj genetikai elkülönülését. A magyarországi *D. sp. n.* példányok vizes élőhelyekről való begyűjtése alapján esetleg habitat-specializációt feltételezhetünk. Németországban és Svédországban dámszarvasból mutatták ki e fajt, ahol a szerzők a dámszarvas gazdafajt tekintették elkülönítő faji karakternek. További kutatások lennének szükségesek, hogy megtudjuk milyen tényezők vezettek e két tüdőféreg faj reprodukzív izolációjához, illetve további egyedek morfológiai vizsgálata is szükséges lenne e faj hivatalos, formális leírásához.

Szélesebb körű gazda-parazita vizsgálatok vezethetnének a tüdőféreg valós, teljes gazdaspektrumának a megismeréséhez, mégpedig a

molekuláris markerekkel jellemzett tüdőféreg fajok teljes elterjedési területén, annak megismerésére, hogy adott parazita fajnak adott földrajzi régióban mely kérődző az elsődleges gazdája. Ezen ismereteknek állategészségügyi haszna is lehet, ismerve a parazita férgek rezervoár gazdafajait. A szarvasmarhák és szarvasfélék tüdőféreggel való mesterséges körülmények közti sikeres kereszt-fertőzése nem bizonyítja azt, hogy azok természetes/valóságos körülmények közt is végbemennek, illetve milyen mértékű a keresztfertőződés. Eredményeim alapján a hazai szarvasfélék nem rezervoárjai a szarvasmarhában élősködő *D. viviparus* tüdőféregnek. Viszont tisztázásra vár még, hogy a szarvasfélék tüdőférgerei (*D. capreolus*, *D. eckerti*, *D. sp. n.*) vajon élősködnek-e szarvasmarhákban. E kutatáshoz jól használható a munkámban alkalmazott *Dictyocaulus* fajazonosítás, molekuláris markerekkel, mint pl. RAPD mintázatok vagy *cox1* szekvenciák. Az esetleges keresztfertőzések, illetve a parazita-gazdafaj viszony részletes megismeréséhez az egyes *Dictyocaulus* fajok/populációk kétséget kizáró azonosítására, és nagy egyedszámú vizsgálatára lenne szükség a keresztfertőződésre esélyes területeken.

A haszonállataink sokféle parazitikus férgre ellen általánosan féreghajtószerekkel védekezünk. Az anthelmintikumokkal szembeni rezisztencia azonban mára világszerte elterjedt. Elsőként juhok és kecskék férgseinél mutatták ki. A féreghajtó szerekkel szemben mutatott rezisztencia egyre komolyabb kihívás elé állítja az állattenyésztőket. Molento és mtsai. (2006) Brazíliából közölték a széles körben használt makrociklikus laktonok közé tartozó féreghajtókkal szembeni rezisztenciát szarvasmarha tüdőférgében (ivermectin, abamectin, moxidectin, doramectin). Argentínából Fiel és mtsai. 2011-ben arról számoltak be, hogy a trichlorfon csupán 52%-os hatékonyságú a

rezisztens *D. viviparus* férgekkel szemben. Ezen anthelmintikumokat hazánkban is gyakran alkalmazzák, így Magyarországon is feltételezhető, vagy várható a rezisztens férgek jelenléte, elterjedése. Szarvasokban élő nagy tüdőférgekben tapasztalt rezisztenciát ugyan eddig még nem közöltek, de ennek a veszélye is fennáll, különösen a *D. eckerti* faj esetében.

A tüdőférgek, és általában a férgek elleni védekezés kemikáliákkal való megoldása várhatóan változni fog a közeljövőben nemcsak a rezisztencia, környezeti terhelés, hanem az egészséges élelmiszerek igénye miatt is. Új hatékony anthelmintikumok bevezetésének kicsi az esélye. A szarvasmarha dictyocaulosis kezelésére már több évtizede próbálkoznak rekombináns vakcina kifejlesztésével. Nemrég újabb vakcina jelöltet közöltek Strube és mtsai (2015). A vizsgálatok alapján e rekombináns vakcina is csak 54%-os védettséget ért el, míg a kontrollként használt hagyományos, besugárzással gyengített L3 lárvákat tartalmazó Dictol vakcina 95%-os hatékonyságú. Tehát még messze vannak a kutatások egy használható rekombináns vakcina kifejlesztésétől. Figyelembe véve a *D. viviparus* elleni vakcina kifejlesztésére fordított erőfeszítéseket (több kutatócsoport több évtizedes kutatómunkája és költségei), nem valószínű, hogy a kisebb jelentőségű szarvasfélék tüdőféreg fajaira is fejlesztenének vakcinát. Kutatásaim alapján a szarvasfélék nagy tüdőférgerei jelentős genetikai különbséget mutatnak a szarvasmarha tüdőférgétől, így a jövőben esetlegesen kifejlesztett hatékony *D. viviparus* elleni vakcina valószínűleg nem lesz hatékony a szarvasfélék tüdőférgesével szemben. Bár a 'major sperm protein 1' antigénre fejlesztés alatt álló vakcina esetleg hatékony lehet, mivel elemzéseim szerint a szarvasmarha és szarvasfélék *Dictyocaulus* fajainak MSP1 génhelyéről átíródó aminosav sorrendek teljes mértékben megegyeznek.

A nagy tüdőférges kerti tartású szarvasokban olykor okozhatnak súlyos megbetegedést, ezáltal gazdasági károkat. Szarvasos kertekben érdemes felkészülni a féregfertőzések kivédésére. A kemikáliák használata több okból is megkérdőjelezhető: (1) rezisztens férgek ellen használhatatlan, (2) elősegíti a rezisztencia kialakulását, (3) a férgek/féreglárvák természetes ellenségeit gyéríti (lokális populációit esetleg ki is pusztítja), (4) anthelmintikum maradványok lehetnek a húsban.

A dictyocaulosis kivédésre több út is kínálkozik.

1. Specifikus vakcina fejleszthető az egyes fajokra, patotípusokra. Ehhez elengedhetetlen a betegséget okozó parazita pontos azonosítása. A munkámban alkalmazott genetikai markerek közül a *cox1* DNS szekvencia választható alkalmas identifikációs markernek e célra.
2. Általános védekezés a parazita férgek ellen természetes féreghajtó anyagokat és/vagy növényeket tartalmazó takarmányozással.
3. Általános védekezés parazita férgek ellen legelőváltással. A paraziták átvitelét befolyásolja a gazdaegyedek távolsága, gazdaegyedek eloszlása. A gazdaegyedek aggregált eloszlása kedvezőbb a paraziták számára. A tüdőférges terjedésének ideje a nyári - kora őszi időszak. Az állandóan legelőn tartott szarvasmarhák esetében különösen nagy az esélye az újrafertőződésnek, ami magyarázhatja a legeltetési szarvasmarha állományok nagyon erős dictyocaulosis járványait.

A filogenetikai elemzéseim szerint a *D. capreolus* faj a legközelebbi rokon faja a *D. viviparus*-nak. A fertőzőképes *D. capreolus* lárvákkal való mesterséges fertőzés a szarvasmarhákban provokált immunitást indukált a

szarvasmarha specifikus *D. viviparus* parazitájával szemben, ami a gazdaidegen vakcinázási lehetőségekre irányítja a figyelmet.

A szarvasmarha tüdőférgével (*D. viviparus*) kapcsolatos vizsgálatokból tudjuk, hogy léteznek 'hipovirulens' nagy tüdőférgek, melyek állandóan jelen vannak a szarvasmarha állományban, de nem okoznak betegséget (Ploeger, 2002). E gyenge patogenitású férgek jellemzésére genetikai markerként használható a mitokondriális *cox1* gén nukleotid sorrendje, mivel eredményeim alapján elegendően változékonny régió, univerzális PCR primerek használhatóak, és 'barcoding' marker lévén más homológ *cox1* szekvenciákkal való nagyszámú összehasonlításuk lehetséges. Elképzelhető, hogy a tüdőférgekben endoparazita mikrobák okozzák a gyenge fertőzőképességet.

A munkámban vizsgált nagy tüdőféreg fajok nagyfokú genetikai diverzitással rendelkeznek, ami magas mutációs rátát feltételez. A tüdőférgek génáramlását, azaz gazdasági szempontból a rezisztencia gének elterjedését a haszonállat állományok karantén szabályainak betartásával lehetne elkerülni, vagy legalábbis lassítani. A fajon belüli genetikai diverzitás szempontjából vizsgált *D. viviparus*, *D. eckerti* és *D. capreolus* fajokhoz hasonlóan várható, hogy a juhban és kecskében igen elterjedt *D. filaria* fajnak is bizonyára jelentős a genetikai diverzitása. A diverz genetikai háttérű parazita fajoknak különösen nagy a mutációs rátájuk, nagy esély van rezisztens változatok kialakulására.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Magyarországon élő *Dictyocaulus* tüdőférgéken először alkalmaztam molekuláris vizsgálatokat, fajazonosítást nemzetközi szakirodalmi ismeretek alapján, és először mutattam ki a *Dictyocaulus capreolus* és egy új faj, a *Dictyocaulus* sp. n. faj magyarországi előfordulását.
2. Az új fajnak tekintett *Dictyocaulus* sp. n. magyarországi példányaiból 5 gén DNS szekvenciáját határoztam meg, melyek közül a citokróm c oxidáz 1 alegység (*cox1*), a sejtmagi riboszomális nagy alegység (28S rDNS) és a 'major sperm protein 1' (MSP1) gének DNS szekvenciái új adatok.
3. DNS szekvencia elemzéseimből megállapítottam a *D. noeneri* Raillet & Henry, 1907 név és a *D. capreolus* Gibbons & Höglund, 2002 faj azonosságát. Mivel a *D. noeneri* leírása hiányos, a *D. capreolus* név használandó e fajra.
4. Először végeztem populációgenetikai vizsgálatot vadon élő kérődzők *Dictyocaulus* férgein. A *cox1* gén DNS szekvencia alapú elemzése alapján kisebb genetikai változatosságot mutattam ki a *D. capreolus* és a *D. sp. n.* fajoknál, mint a *D. eckerti* faj esetében.
5. Kimutattam, hogy a vadon élő *D. eckerti* tüdőféreg populációk gyengén strukturáltak, feltehetően a nagy génáramlás következtében. Ennek oka valószínűleg a gazdaállat (gímszarvas)

csoportos viselkedése, alkalmi vándorlása, illetőleg populáció-expanziója.

6. Kis elemszámú vizsgálat alapján feltételezhető, hogy a *D. capreolus* magyarországi populációi közepesen fragmentáltak, közepes génáramlást mutatva. Az alföldi populáció több mint négyszer nagyobb genetikai diverzitással rendelkezik a dél dunántúli populációhoz viszonyítva. Ennek feltételezhető oka a mezei őz ősztől tavaszig tartó csoportos viselkedése.
7. Új gazda-parazita kapcsolatokat mutattam ki: *Cervus elaphus* – *Dictyocaulus capreolus*, *Cervus elaphus* – *Dictyocaulus* sp. n., és molekuláris markerekkel először igazoltam a *Capreolus capreolus* – *Dictyocaulus eckerti* parazita viszonyt.
8. Az 5 gén DNS szekvenciája alapján filogenetikai rokonsági viszonyokat állapítottam meg a *Dictyocaulus* fajok között. A nemen belül 3 fő filogenetikai csoportot különböztettem meg: (1) *D. filaria*, (2) *D. arnfieldi* és (3) szarvasfélékben (Cervidae), tülkösszarvúakban (Bovidae) élősködő tüdőférges csoportját, amit a *D. capreolus*, *D. eckerti*, *D. viviparus*, *D. sp. n.* és *D. sp. 'gím-Új-Zéland'* fajok alkotnak. Kimutattam a *D. capreolus* faj bazális helyeződését a (3) csoporton belül.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A kérődzők és lófélék tüdőféreg (*Dictyocaulus* spp.) fertőzöttsége (dictyocaulosis) jól ismert probléma az állattenyésztők és vadgazdák számára világszerte. A háziállatok közt szórványosan kialakuló dictyocaulosis járványok oka nem teljesen tisztázott, egyesek szerint a vadon élő állatok szolgálnak rezervoárként e parazitáknak. A szarvasfélék (Cervidae) legfontosabb parazitájának a tüdőféregket tekintik, legalábbis kerti tartás esetén. Az egyes *Dictyocaulus* fajok morfológiai elkülönítése morfológiai jellegeik alapján kétséges, a molekuláris módszerek viszont jelentős segítséget jelentenek e téren.

Kifejlett tüdőféregket gyűjtöttünk be a vadászatokon elejtett szarvasok, így dámszarvasok (*Dama dama*), gímszarvasok (*Cervus elaphus*) és őzek (*Capreolus capreolus*) légsöveiből és hörgőiből. A minták Magyarország 23 helyéről származtak, illetve egy gyűjtőhelyről a szomszédos Romániából. Teljes genomiális DNS-t vontam ki egyedenként 312 féreg példányból. Öt gén fragmentumon végeztem PCR-es felsokszorozítást majd DNS szekvenálást: sejtmagi riboszomális kis alegység (18S rDNS), riboszomális nagy alegység (28S rDNS), riboszomális 'internal transcribed spacer 2' (ITS2), 'major sperm protein 1' (MSP1) és mitokondriális citokróm c oxidáz 1 alegység (cox1). 5 lókuszon végeztem filogenetikai elemzést a hazai szarvasfélék nagy tüdőféreg mintáinak felhasználásával. A 4 sejtmagi és egy mitokondriális genomban elhelyezkedő lókusznukleotid polimorfizmus mintázata különböző mértékű volt, ami alkalmassá tette az analízist, hogy a közeli és régmúlt evolúciós kapcsolatokat is feltárhasson. A filogenetikai elemzés 3 erősen alátámasztott kládba sorolta a magyarországi tüdőféreg mintákat (99% bootstrap támogatás). A DNS szekvencia divergenciák

kládon belüli (<2%) és kládok közötti (>13%) értékeiből következtetve, a 3 klád különböző tüdőféreg fajoknak felel meg, melyek szimpatrikusan élnek Magyarországon. Az analízis során egy leíratlan fajt mutattam ki, melyet *D. sp. n.*-nek neveztem munkámban. A rejtett faj létét mind az 5 vizsgált gén elemzése alátámasztotta. A *D. sp. n.* példányokat délnyugat magyarországi gímszarvasokból gyűjtöttük be.

A *Dictyocaulus* nemén belül 3 filogenetikai evolúciós vonal különböztethető meg. A (1) *D. filaria* és (2) a *D. arnfeldi* jelentősen eltérnek egymástól csakúgy, mint a (3) szarvasfélékben (Cervidae) és tülkösszarvúakban (Bovinae) élő tüdőféregtől. A *cox1* szekvenciák alapján az utóbbi (3) csoportban 5 *Dictyocaulus* filogenetikai faj különböztethető meg: *D. capreolus*, *D. eckerti*, *D. viviparus*, *D. sp. n.* és 'D. sp. gím-Új-Zéland' fajok. Ez utóbbi, új-zélandi gímből származó tüdőféreg genotípus valószínűleg újabb rejtett fajt reprezentál a *Dictyocaulus* nemén belül, mely legközelebbi rokonságot az európai *D. eckerti* fajjal mutat. A *D. capreolus* faj nagy valószínűséggel bazális helyzetű a többi faj alkotta klaszterhez viszonyítva.

Eredményeim alapján az OPB-01 primerrel való RAPD analízis alkalmasnak tűnik a szarvasfélékben élő *Dictyocaulus* fajok elkülönítésére, azonosítására, legalábbis a magyarországi tüdőféreg esetében.

A gazda-parazita kapcsolatokat illetően kimutattam, hogy a vizsgált területen a *D. eckerti* elsődleges gazdaállata a gímszarvas. Annak ellenére, hogy mindhárom szarvasféléből előkerültek *D. eckerti* minták (n=184), a férgek nagy többsége gímszarvasból származott (n=158). Dámvadakból származó minden tüdőférget (n=13) *D. eckerti*-nek azonosítottam. Csupán egy *D. capreolus* féreg származott gímszarvasból, a többi 34 parazita őzből. Következésképpen a *D. capreolus* az őz

specialistája, legalábbis Magyarországon. A *D. capreolus* gímszarvasban való előfordulása új gazda-parazita kapcsolat. Emellett első alkalommal mutattam ki molekuláris vizsgálattal a *D. eckerti* előfordulását őzben. A *D. sp. n.* példányok kizárólag gímszarvasból származtak. A korábbi véleménynel ellentétben, miszerint a *Dictyocaulus* fajoknak széles gazdakörük van, az újabb vizsgálatok és a saját eredmények alapján, a *Dictyocaulus* fajok csupán egy vagy néhány gazdafajban képesek élősködni. Kivéve a *D. eckerti* tüdőféreg, amely generalista faj. Kimutattam továbbá a *D. eckerti* és *D. sp. n.* szimpatrikus elterjedését, azonos élőhelyét, és az azonos gazdafajukat (gímszarvas). Nem találtam olyan ökológiai tényezőt, mely a genetikai elkülönülésüket alátámaszthatta volna. Mivel a szarvasmarhák és vadon élő szarvasok gyakran ugyanazt a legelőt használják, elméletileg nagy lehetőség lenne a szarvasmarha és a szarvasok tüdőférgesével való keresztfertőződésre. Viszont egyetlen *D. viviparus* férget sem találtam a vizsgált szarvasfélékben.

Elsőként végeztem populációgenetikai analízist vadon élő kérődzők nagy tüdőférgesin. Vizsgálatom a természetes környezetben levő *Dictyocaulus* tüdőférgesek genetikai strukturáltságát célozta feltárni, szarvasféle gazdaállatokra fókuszálva. Munkám magas fokú nukleotid variabilitást mutatott ki a *Dictyocaulus* fajokon belül. A *D. capreolus* kisebb genetikai diverzitást mutatott ($\pi=0,0086$), mint a *D. eckerti* ($\pi=0,0184$). A *D. eckerti* populációgenetikai elemzése nagyfokú génáramlást mutatott a gyengén strukturált térbeli populációk között és a tanulmányozott 3 szimpatrikus szarvas gazdafaj szerint is. Az eredmények alapján a *D. eckerti* a vadon élő kérődzők diverz genetikai hátterű, generalista élősködője.

A vizsgált *D. eckerti* populációk genetikailag változatosak ($\pi=0,0099-0,0239$), de a haplotípus-eloszlásuk látszólag nem mutat populációs különbségeket. Míg a *D. capreolus* csak Európából és Kis Ázsiából ismert, addig a *D. eckerti* világszerte elterjedt a mérsékelt övben: Észak-Amerika, Európa, Szibéria és Új-Zéland.

A vizsgált *Dictyocaulus* fajok két különböző populációgenetikai osztályt mutattak. (1) *D. eckerti* gazdái nagy vándorlási hajlammal rendelkeznek, és alacsony populációs elkülönültséget mutatnak ($F_{ST}\leq 0,044$). (2) A *D. capreolus* közepes populációgenetikai struktúrát mutat ($F_{ST}=0,15$), ami vélhetően az őz gazda diszperziós viselkedésének a következménye.

Jelentős különbség van a gazdaállatok diszperziós mintázatai között is. A *D. eckerti* gazdái, a dāmivad és a gímszarvas, nagy távolságokra vándorolhatnak, míg az őz kevésbé vándorló, territoriális fajnak tekinthető. Feltételezhetjük, hogy a tüdőféreg fertőzések a nagy egyedszámú csapat egyedei között nagyobb valószínűséggel történnek meg (gímszarvas, mezei őz), mint a magányos vagy kis egyedszámú csapat egyedei között (erdei őz). Így a gazdafajok eltérő vándorlása és diszperziós viselkedése jelentősen befolyásolhatja a tüdőféreg populációgenetikai struktúráit.

Feltételezésem szerint a *D. eckerti* populáció expanziójának hátterében a gazdafaj populáció növekedése állhat. A becsült populáció expanziós idő egybevág gazdaállatának a legutolsó jégkorszak utáni vándorlásával és populáció méretének növekedésével, szétterjedésével. A gímszarvas európai expanziója megközelítőleg 10.000 évvel ezelőtt kezdődött.

A magyarországi gímszarvasok többsége már szopós korban, az első nyáron fertőződik *Dictyocaulus* tüdőféreggel. Míg szarvasborjakban 75%-os, őzgidákban 31-40% prevalencia tapasztalható. A jelen dolgozat felismeréseinek jelentős következménye lehet a tüdőféreg kezeléseknél,

mivel a génáramlás elősegíti az anthelmintikum rezisztencia hathatós elterjedését, ami komoly probléma számos parazita féreg elleni védekezésben. Anthelmintikumok elleni rezisztencia jelenséget már közöltek szarvasmarha tüdőférgénél. Vizsgálataimból feltételezhető, hogy ennek a lehetősége fennáll, illetve az új mutációk gyorsan elterjedhetnek a generalista *D. eckerti* populációi között is. A jelenleg használatos féreghajtó szerekkel szembeni rezisztencia széleskörűen elterjedt és gyakori egyes parazita férgekénél, ami új védekezési módszerek keresését teszi szükségessé. A tüdőférgesről való ismeretek bővülésével lehetőség nyílik arra, hogy azonosítsuk a férgek biológiájának azon jellegeit, melyek a védekezési módszerek fejlesztésére használható.

9. SUMMARY

Lungworm (*Dictyocaulus* spp.) infection (dictyocaulosis) in ruminants and horses is a well known problem for livestock farmers and wildlife managers throughout the world. The cause of sporadic outbreaks of dictyocaulosis in domestic animals is not completely understood, but it has been suggested that wild animals may serve as reservoirs for the parasites. Lungworms are considered to be the most important parasites in deer (Cervidae), at least in farms. It is often difficult to morphologically distinguish closely related *Dictyocaulus* species, but molecular markers provide a powerful means to define them.

Adult large lungworms were collected from the trachea and bronchi of the following deer species harvested during hunting: fallow deer (*Dama dama*), red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*). Samples were taken from 23 sites in Hungary and one locality in neighbouring Romania. Total genomic DNA was extracted from each of 312 worm specimens. Five gene fragments were PCR amplified and sequenced: ribosomal small subunit (18S rDNA), ribosomal large subunit (28S rDNA), ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2), major sperm protein 1 (MSP1) and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1). I conducted phylogenetic analyses for large lungworms of Hungarian deer species, based on 5 genetic loci mentioned above. Patterns in polymorphisms between the 4 nuclear and 1 mitochondrial loci were different. Therefore analyses were applicable to provide recent and distant evolutionary insights. Phylogenetic analyses revealed that *Dictyocaulus* sequences of Hungarian lungworm samples grouped into 3 strongly supported clades (99% bootstrap support). Given patterns of DNA sequence divergence within (<2%) and between clades (>13%), the

results strongly suggest that these 3 clades correspond to separate lungworm species, they live in sympatry in Hungary. I identified an undescribed cryptic species in the analysis, referred to here as *D. sp. n.*, supported by analyses of all 5 gene sequences. Specimens of *D. sp. n.* were collected from red deer only, and in South-West Hungary only.

Three evolutionary lineages differ significantly within the *Dictyocaulus* genus: (1) *D. filaria*, (2) *D. arnfieldi*, and (3) lungworms living in deer (Cervidae) and ungulates with cloven horn (Bovinae). Five *Dictyocaulus* species can be separated based on *cox1* phylogenetic analyses for group (3): *D. capreolus*, *D. eckerti*, *D. viviparus*, *D. sp. n.* and '*D. sp. red deer-New-Zealand*'. This last lungworm species, which has a genotype identified from red deer in New Zealand, likely represents an additional new cryptic species within the genus *Dictyocaulus*, with a close relationship to European *D. eckerti* species. *D. capreolus* is positioned more basally to the other species within the clade.

Based on my results, the RAPD analysis using the OPB-01 primer seems applicable to separate and identify *Dictyocaulus* species, at least for lungworms in Hungary.

Regarding host relationships, I show that red deer is the primary host for *D. eckerti* within the region sampled. Although *D. eckerti* samples (n=184) were recovered from all three deer species considered here, the vast majority of worms originated from red deer (n=158). All of the 13 lungworms collected from fallow deer were identified as *D. eckerti*. Only one *D. capreolus* worm was originated from red deer, with the additional 34 worms were sampled from roe deer. Thus, my data suggest that *D. capreolus* is a roe deer specialist, at least in Hungary. The identification of *D. capreolus* from red deer represents a new host-parasite record. In addition, this is the first time that *D. eckerti* has been recorded from roe

deer confirmed by a molecular study. *D. sp. n.* specimens were collected exclusively from red deer. Despite previous suggestions that *Dictyocaulus* species have a broad host spectrum, it is now clear from other studies and my own that lungworm species are capable of infecting only one or a few host species, except *D. eckerti*, which is a generalist species. Interestingly, I demonstrate that *D. eckerti* and *D. sp. n.* are sympatric, share similar ecological habitats, and the same host species (red deer). I did not find any ecological factors underlying the genetic differentiation between them. As wild deer and cattle often use the same grazing sites, theoretically there could be a high possibility of cross infection between deer and cattle lungworms. However, I did not find any *D. viviparus* lungworms in deer.

This study represents the first population genetic analysis of large lungworms in wild animals. My survey aimed to reveal the population genetic structure of *Dictyocaulus* lungworms in natural wildlife, focussing on deer host species. My work indicates high nucleotide variation for wild lungworm species of deer. *D. capreolus* samples showed lower genetic diversity ($\pi=0.0086$) than *D. eckerti* samples ($\pi=0.0184$).

Population genetic analyses for *D. eckerti* revealed high gene flow among weakly structured spatial populations and the three sympatric host deer species considered here. These results suggest that *D. eckerti* is a widespread generalist parasite in ungulates with a diverse genetic background. The *D. eckerti* populations included here are genetically variable ($\pi=0.0099-0.0239$), but there were no clear differences between populations according to haplotype distributions. While *D. capreolus* are recorded only from Europe and Asia Minor, *D. eckerti* is widely distributed in temperate regions worldwide, such as North America, Europe, Siberia and New Zealand.

The *Dictyocaulus* species considered here show two distinct population genetic classes: (1) *D. eckerti* has high host vagility, and shows low population differentiation ($F_{ST} \leq 0.044$). (2) *D. capreolus* in host populations with moderate vagility shows moderate population structure ($F_{ST} = 0.15$), which may be a consequence of the limited dispersal behaviour of its roe deer hosts.

There are considerable differences in the dispersal patterns of the hosts examined. Fallow deer and red deer, which host *D. eckerti*, may migrate large distances, while roe deer migrate less, and are considered to be a territorial species. It is assumed that cross-infection is more probable among group members (red deer and field-based roe deer) than among dispersed forest-based roe deer individuals. Therefore I suggest that the differing vagility and dispersal behaviour of host species are important contributing factors to the population structure of lungworms.

The estimate for a relatively recent *D. eckerti* population expansion are likely to be driven by the population expansion of its hosts. The population expansion time estimation is concordant with host migration and population expansion after the last ice age. Red deer in Europe experienced population expansions approximately 10,000 years ago.

The majority of red deer in Hungary became infected by lungworms during their first summer (75% prevalence in calves), while in roe deer fawns 31-40% prevalence was recorded. The findings in this thesis have considerable implications for lungworm management, particularly since high gene flow enhances the efficient spread of anthelmintic resistance, which is a serious problem for the management of several parasitic worms. Evidence of anthelmintic resistance in lungworms of cattle has yet been published, and this study demonstrates that there is considerable potential for the emergence and rapid spread of new mutations among

populations of *D. eckerti* as well. Resistance to current anthelmintics is now widespread and commonplace for other parasitic worm species, motivating the search for new control methods. Increased knowledge of lungworms increases the likelihood of identifying aspects of worm biology that could be exploited to improve control methods.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönet illeti Dr. Sugár László témavezetőmet, amiért az általa begyűjtött tüdőférgeket rendelkezésemre bocsátotta, és a sok hasznos tanácsáért, tapasztalataért, amiket megosztott velem. Köszönettel tartozom Dr. Kovács Szilviának az *Elaphostrongylus* férgekért, illetve Antal Sándor, Horváth Ágnes, Süle Árpád és Száraz László vadászoknak, a szarvas, őz és vaddisznó tüdő mintákért.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Alemu, S., Leykun, E.G., Ayelet, G., Zeleke, A. (2006). Study on small ruminant lungworms in northeastern Ethiopia. *Vet. Parasitol.* 142(3-4): 330-335.
2. Allendorf, F.W. (1983). Isolation, gene flow and genetic differentiation among populations. In: Schonewald-Cox CM, Chambers SM, MacBryde B, Thomas WL (Szerk.) *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Plant and Animal Populations*. Benjamin/Cummings, New York, 51-66.
3. Anderson, R.C. (2000). Order Strongylida (the bursate nematodes). In: *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission*, 2. kiadás. C.A.B. International, University Press, Wallingford: 41-229.
4. Anderson, R.C., Chabaud, A.G., Wilmott, S. (1974). C.I.H keys to the nematode parasites of vertebrates. No. 1. General Introduction. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal.
5. Archie, E.A., Ezenwa, V.O. (2011). Population genetic structure and history of a generalist parasite infecting multiple sympatric host species. *Int. J. Parasitol.* 41: 89-98.
6. Audebert, F., Chilton, H., Justine, J.L., Gallut, C., Tillier, C., Durette-Desset, M.C. (2005). Additional molecular evidence to support a sister taxon relationship between Heligmosomoidea and Molineoidea nematodes (Trichostrongylina). *Parasitol. Res.* 96: 343-346.
7. Barrett, L.G., Thrall, P.H., Burdon, J.J., Linde, C.C. (2008). Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends. Ecol. Evol.* 23(12): 678-685.
8. Bellocq, J.G., Ferté, H., Depaquit, J., Justine, J., Tillier, A., Durette-Desset, M.C., (2001). Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 19(3): 430-442.
9. Bensasson, D., Zhang, D.X., Hartl, D.L., Hewitt, G.M. (2001). Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.* 16(6): 314-321.
10. Bergstrom, R.C. (1983). *Aphodius* beetles as biological control agent of elk lungworm, *Dictyocaulus hadweni*. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 50: 236-239.
11. Bergstrom, R.C., Maki, L.R., Werner, B.A. (1976). Small dung beetles as biological control agents: laboratory studies of beetle action on trichostrongylid eggs in sheep and cattle feces. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 43(2): 171-174.
12. Berrag, B., Urquhart, G.M., (1996). Epidemiological aspects of lungworm infections of goats in Morocco. *Vet. Parasitol.* 61: 81-95.
13. Bienioschek, S., Rehbein, S., Ribbeck, R. (1996). Cross-infections between fallow deer and domestic ruminants with large lungworms (*Dictyocaulus* spp.). *Appl. Parasitol.* 37: 229-38.
14. Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Lui, L.X., Scheldemann, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, N., Frisse, L.M., Vida, J.T.,

- Thomas, W.K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.
15. Blouin, M.S. (1998). Mitochondrial DNA diversity in nematodes. *J. Helminthol.* 72: 285-289.
 16. Blouin, M.S. (2002). Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int. J. Parasitol.* 32: 527-531.
 17. Blouin, M.S., Dame, J.B., Tarrant, C.A., Courtney, C.H. (1991). Unusual population genetics of a parasitic nematode mtDNA variation within and among populations. *Evolution* 46(2): 470-476.
 18. Blouin, M.S., Liu, J., Berry, R.E. (1999). Life cycle variation and the genetic structure of nematode populations. *Heredity* 83: 253-259.
 19. Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B. (1995). Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 141: 1007-1014.
 20. Boomker, J., Horak, I.G., Flamand, J.R.B. (1991). Parasites of South African wildlife. X. Helminths of red duikers, *Cephalophus natalensis*, in Natal. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 58(3): 205-209.
 21. Boomker, J., Horak, I.G., Flamand, J.R., Keep, M.E. (1989). Parasites of South African wildlife. III. Helminths of common reedbeek, *Redunca arundinum*, in Natal. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 56(1): 51-57.
 22. Borgsteede, F.H.M., Jansen, J., Nispen Tot Pannerden, H.P.M., Burg, W.P.J., Noorman, N., Poutsma, J., Kotter, J.F. (1990). A study of the endoparasitic helminth fauna of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in the Netherlands. *Z. Jagdwiss.* 36(2): 104-109.
 23. Boyle, A.G., Houston, R. (2006). Parasitic pneumonitis and treatment in horses. *Clin. Tech. Equine Pract.* 5: 225-232.
 24. Böhm, M., White, P.C.L., Daniels, M.J., Allcroft, D.J., Munro, R., Hutchings, M.R. (2006). The health of wild red and sika deer in Scotland: An analyses of key endoparasites and recommendations fo monitoring disease. *Vet. J.* 17: 287-294.
 25. Braisher, T.L., Gemmell, N.J., Grenfell, B.T., Amos, W. (2004). Host isolation and patterns of genetic variability in three populations of *Teladorsagia* from sheep. *Int. J. Parasitol.* 34: 1197-1204.
 26. Cagnacci, F., Focardi, S., Heurich, M., Stache, A., Hewison, A.J.M., Morellet, N., Kjellander, P., Linell, J.D.C., Mysterud, A., Neteler, M., Delucchi, L., Ossi, F., Urbano, F. (2011). Partial migration in roe deer: migratory and resident tactics are end points of a behaviour gradient determined by ecological factors. *Oikos* 120: 1790-1802.
 27. Cantacessi, C., Gasser, R.B., Strube, C., Schneider, T., Jex, A.R., Hall, R.S., Campbell, B.E., Young, N.D., Ranganathan, S., Sternberg, P.W., Mitreva, M. (2010). Deep insights into *Dictyocaulus viviparus* transcriptomes provides unique prospects for new drug targets and disease intervention. *Biotechnol. Adv.* 29(3): 261-271.

28. Carreno, R.A., Nadler, S.A. (2003). Phylogenetic analyses of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences. *J. Parasitol.* 89(5): 965-973.
29. Carreno, R. A., N. Diez-Baños, M. Hidalgo-Argüello, and S. A. Nadler. (2009). Characterization of *Dictyocaulus* species (Nematoda: Trichostrongyloidea) from three species of wild ruminants in northwestern Spain. *J. Parasitol.* 95: 966-970.
30. Chilton, N.B., Gasser, R.B., Beveridge, I. (1997). Phylogenetic relationships of Australian strongyloid nematodes inferred from ribosomal DNA sequence data. *Int. J. Parasitol.* 27: 1481-1494.
31. Chilton, N.B., Huby-Chilton, F., Gasser, R.B., Beveridge, I. (2006). The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. *Mol. Phyl. Evol.* 40: 118-128.
32. Chitwood, M.B. (1969). The systematics and biology of some parasitic nematodes. *Chem. Zool.* 3. 223-244.
33. Citillas, C., Espina, C., Spakulová, M., Arias, P., (1995). Differential diagnosis of lung nematode parasites from livestock by electrophoretic techniques. *Int. J. Parasitol.* 25(2): 215-220.
34. Conole, J.C., Chilton, N.B., Jarvis, T., Gasser, R.B., (1999). Intraspecific and interspecific variation in the second internal transcribed spacer (ITS-2) sequence for *Metastrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) detected by high resolution PCR-RFLP. *Int. J. Parasitol.* 29: 1935-40.
35. Conole, J.C., Chilton, N.B., Jarvis, T., Gasser, R.B., (2001). Mutation scanning analysis of microsatellite variability in the ITS-2 (precursor ribosomal RNA) for three species of *Metastrongylus* (Strongylida: Metastrongyloidea). *Parasitology.* 122: 195-206.
36. Corrigan, W., Coutts, A.G.P., Watt, C.F., Hunter, A.R., Munro, R. (1988). Comparison by experimental infections in cattle of a *Dictyocaulus* species occurring naturally in red deer and *Dictyocaulus* of bovine origin. *Vet. Rec.* 122: 302-304.
37. Cottee, P.A., Nisbet, A.J., Boag, P.R., Larsen, M. Gasser, R.B. (2004). Characterization of major sperm protein genes and their expression in *Oesophagostomum dentatum* (Nematoda: Strongylida). *Parasitol.* 129: 479-490.
38. Cuadrado, R., Maldonado-Moll, J.F., Segarra, J. (1980). Gapeworm infection of domestic cats in Puerto Rico. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 996-997.
39. David, G.P. (1997). Survey on lungworm in adult cattle. *Vet. Rec.* 141: 343-344.
40. Denton, G.H., Anderson, R.F., Toggweiler, J.R., Edwards, R.L., Schaefer, J.M., Putnam, A.E. (2010). The last glacial termination. *Science* 328:1652-1656.
41. Denver, D.R., Morris, K., Lynch, M., Vassilieva, L.L., Thomas, W.K. (2000). High direct estimate of the mutation rate in the mitochondrial genome of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 289: 2342-2344.
42. Divina, B.P., Wilhelmsson, E., Mattsson, J.G., Waller, P., Höglund, J., (2000). Identification of *Dictyocaulus* spp. in ruminants by morphological and molecular analyses. *Parasitology.* 121: 193-201.

43. Divina, B. P. és Höglund, J. (2002). Heterologous transmission with *Dictyocaulus capreolus* from roe deer (*Capreolus capreolus*) to cattle (*Bos taurus*). J. Helminthol. 76: 125-130.
44. Divina, B.P., Wilhelmsson, E., Morner, T., Mattsson, J.G., Höglund, J., (2002). Molecular identification and prevalence of *Dictyocaulus* spp. (Trichostrongyloidea: Dictyocaulidae) in Swedish semi-domestic and free-living cervids. J. Wildl. Dis. 38: 769–75.
45. Dougherty, E.C. (1951). Evolution of zooparasitic groups in the phylum Nematoda, with special reference to host-distribution. J. Parasitol. 37: 353-378.
46. Drozd, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J. (1989). The helminth fauna of free-ranging European bison, *Bison bonasus* (L.). Acta Parasitol. Polonica. 34(2): 117-124.
47. Durette-Desset, M.C., Hugonnet, L., Chabaud, A.G. (1988). Redescription de *Dictyocaulus noereri* Railliet et Henry 1907, parasite de *Capreolus capreolus* en Europe. Comparaison avec *D. viviparus* (Bloch) parasite du be'tail. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 63: 285–95.
48. Durette-Desset, M.C., Chabaud, A.G., (1993). Nomenclature des Strongylida au-dessus du groupe famille. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 68: 111-112.
49. Durette-Desset, M.C., Beveridge, I., Spratt, D.M. (1994). The origins and evolutionary expansion of the Strongylida (Nematoda). Int. J. Parasitol. 24: 1139-1165.
50. Eckert, J., Kutzer, E., Rommel, M., Bürger, H.J., Körting, W. (1992). Veterinärmedizinische Parasitologie. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg: 751.
51. Ellis, J.T., Morrison, D.A., Reichel, M.P. (2003). Genomics and its impact on parasitology and the potential for development of new parasite control methods. DNA Cell Biol. 22(6): 395-403.
52. Enigk, K., Hildebrandt, J. (1965). Host specificity of *Dictyocaulus*-species in ruminants. Vet. Med. Rev. 2: 80-97.
53. Epe, C., Bienioschek, S., Rehbein, S., Schnieder, T., (1995). Comparative RAPD PCR analysis of lungworms (Dictyocaulidae) from fallow deer, cattle, sheep and horses. Zentralbl. Veterinarmed. 42: 187–91.
54. Epe, C., Samson-Himmelstjerna, G.V., Schnieder, T., (1997). Differences in a ribosomal DNA sequence of lungworm species (Nematoda: Dictyocaulidae) from fallow deer, cattle, sheep and donkeys. Res. Vet. Sci. 62: 17–21.
55. Felsenstein, J., (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17: 368-376.
56. Fiel, C., Guzmán, M., Steffan, P., Prieto, O., Bhushan, C. (2011). Comparative efficacy of trichlorphon and trichlorphon/ivermectin combination treatment against anthelmintic-resistant cattle nematodes in Argentina. Parasitol. Res. 109(1): S105-112.
57. Fincher, G.T. (1973). Dung beetles as biological control agents for gastrointestinal parasites of livestock. J. Parasitol. 59: 396-399.
58. Fletcher, T.J. (1982). Management problems and disease in farmed deer. Vet. Rec. 111: 219-223.

59. Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
60. Gajadhar, A., Steeves-Gurnsey, T., Kendall, J., Lankester, M., Stéen, M. (2000). Differentiation of dorsal-spined elaphostrongyline larvae by polymerase chain reaction amplification of ITS-2 of rDNA. *J. Wildl. Dis.* 36(4): 713-722.
61. Gånheim, C., Höglund, J., Waller, K.P. (2004). Acute phage proteins in response to *Dictyocaulus viviparus* infection in calves. *Acta Vet. Scand.* 45: 79-86.
62. Gao, J.F., Zhao, Q., Liu, G.H., Zhang, Y., Wang, W.T., Chang, Q.C., Wang, C.R., Zhu, X.Q. (2014). Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of the two ruminant hookworms *Bunostomum trigonocephalum* and *Bunostomum phlebotomum*. *Gene*, 541(2): 92-100.
63. Gasser, R.B. (1997). Mutation scanning methods for the analysis of parasite genes. *Int. J. Parasitol.* 27: 1449-63.
64. Gasser, R.B. (1999). PCR based technology in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.* 84: 229-58.
65. Gasser, R.B., Chilton, N.B., (2001). Applications of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular evolution of parasitic nematodes. *Vet. Parasitol.* 101: 201-13.
66. Gasser, R.B., Chilton, N.B., Hoste, H., Beveridge, I., (1993). Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Res.* 21: 2525-2526.
67. Gasser, R.B., Jabbar, A., Mohandas, N., Höglund, J., Hali, R.S., Littlewood, D.T., Jex, A.R. (2012). Assessment of the genetic relationship between *Dictyocaulus* species from *Bos taurus* and *Cervus elaphus* using complete mitochondrial genomic datasets. *Parasit. Vectors* 5: 241.
68. Gasser, R.B., Zhu, X.Q., (1999). Sequence-based analysis of DNA fragments by mutation detection techniques. *Parasitol. Today.* 15: 462-5.
69. Gasser, R.B., Monti, J.R., Qian, B-Z., Polderman, A.M., Nansen, P., Chilton, N.B., (1998). A mutation scanning approach for the identification of hookworm species and analysis of population variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92:303-12.
70. Gassó, D., Rossi, L., Mentaberre, G., Casas, E., Velarde, R., Nosal, P., Serrano, E., Segales, J., Fernandez-Llario, P., Feliu, C. (2014). An identification key for the five most common species of *Metastrongylus*. *Parasitol. Res.* 113(9): 3495-3500.
71. Gibbons, L.M., Höglund, J. (2002). *Dictyocaulus capreolus* n. sp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) from roe deer, *Capreolus capreolus* and moose, *Alces alces* in Sweden. *J. Helminthol.* 76: 119-25.
72. Gibbons, L.M., Khalil, L.E. (1988). A revision of the genus *Dictyocaulus* Railliet & Henry, 1907 (Nematoda: Trichostrongyloidea) with the description of *D. africanus* n. sp. from African artiodactylids. *J. Afr. Zool.* 102: 151-175.
73. Gilabert, A., Wasmuth, J.D. (2013). Unravelling parasitic nematode natural history using population genetics. *Trends Parasitol.* 29: 438-448.

74. Gouy de Bellocq, J., Ferte, H., Depaquit, J., Justine, J.L., Tillier, A., Durette-Desset, M.C. (2001). Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 19(3): 430-442.
75. Gronvold, J., Jorgensen, R.J., (1987). Spread of lungworm (*Dictyocaulus viviparus*) infection by *Pilobolus* fungi among stabled calves. *Prev. Vet. Med.* 5(1): 43-50.
76. Guildal, J.A. (1962). Endoparasites of Danish red deer (*Cervus elaphus* L.) and Danish fallow deer (*Dama dama* L.) Konglige Veterinaer og Landobohojkskole Aarskrift, pp. 49-61.
77. Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
78. Hall, B.G., (2001). *Phylogenetic trees made easy*. Sinauer Associates. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA.
79. Harpending, H.C., Sherry, S.T., Rogers, A.R., Stoneking, M. (1993). Genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthr.* 34: 483-496.
80. Hartl, D.L., Clark, A.J. (1997). *Principles of Population Genetics*, 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland: 118-119.
81. Hawdon, J.M., Li T., Zhan, B., Blouin, M.S. (2001). Genetic structure of populations of the human hookworm, *Necator americanus*, in China. *Mol. Ecol.* 10: 1433-1437.
82. Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA bar-codes. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B* 270: 313–322.
83. Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* 2: 1657–1663
84. Hildebrandt, L. (1962). Die Empf nlichkeit der Hauswiederk uer und des Hochwildes f r *Dictyocaulus viviparus* und *Dictyocaulus filaria* (Strongylata). DR. met.vet. Thesis Hanover School of Veterinary Medicine.
85. Hoskin, S.O., Wilson, P.R., Charleston, W.A.G., Barry, T.N., (2000). A model for study of lungworm (*Dictyocaulus* sp.) and gastrointestinal nematode infection in young red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. Parasitol.* 88: 199-217.
86. Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M., Hoskin, S.O. (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22: 253-261.
87. Höglund, J., Engström, A., Morrison, D.A., Mattsson, J.G. (2004). Genetic diversity assessed by AFLP analysis of the parasitic nematode *Dictyocaulus viviparus*, the lungworm of cattle. *Int. J. Parasitol.* 34: 475-484.
88. Höglund, J., Engström, A., Morrison, D.A., Mineur, A., Mattsson, J.G. (2008). Limited sequence variation in the major sperm protein 1 (MSP) gene within populations and species of the genus *Dictyocaulus* (Nematoda). *Parasitol. Res.* 103: 11-20.
89. Höglund, J., Morrison, D.A., Divina, B.P., Wilhelmson E., Mattson J.G., (2003). Phylogeny of *Dictyocaulus* (lungworms) from eight species of

- ruminants based on analyses of ribosomal RNA data. *Parasitology*, 127(2): 179-87.
90. Höglund, J., Morrison, D.A., Mattsson, J.G., Engström, A. (2006). Population genetics of the bovine/cattle lungworm (*Dictyocaulus viviparus*) based on mtDNA and AFLP marker techniques. *Parasitology*, 133: 89-99.
 91. Höglund, J., Wilhelmsson, E., Christensson, D., Mörner, T., Waller, P., Mattsson, J.G., (1999). ITS2 sequences of *Dictyocaulus* species from cattle, roe deer and moose in Sweden: molecular evidence for a new species. *Int. J. Parasitol.* 29: 607–11.
 92. Hörning, B., Wandeler, A. (1968). Der Lungenwurmbefall von Reh und Gemse in einigen Gebieten der Schweiz. *Rev. suisse zool.* 75: 597-608.
 93. Hu, M., Höglund, J., Chilton, N.B., Zhu, X. and Gasser, R. B. (2002). Mutation scanning analysis of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 reveals limited gene flow among bovine lungworm subpopulations in Sweden. *Electrophoresis* 23: 3357-3363.
 94. Hu, M., Chilton, N.B., Abs El-Osta, Y.G., Gasser, R.B. (2003). Comparative analyses of mitochondrial genome data for *Necator americanus* from two endemic regions reveals substantial genetic variation. *Int. J. Parasitol.* 33(9): 955-963.
 95. Hudson, R.R., Slatkin, M., Maddison, W.P. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583-589.
 96. Hugonnet, L. és Cabaret, J. (1987). Infection of roe-deer in France by the lung Nematode, *Dictyocaulus eckerti* Skrjabin, 1931 (Trichostrongyloidea): influence of environmental factors and host density. *J. Wildl. Dis.* 23(1): 109-112.
 97. Iqbal, Z., Lateef, M., Jabbar, A., Muhammad, G., Khan, M.N. (2005). Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. *J. Ethnopharmacol.* 102: 256–261.
 98. Iqbal, Z., Lateef, M., Jabbar, A., Ghayur, M.N., Gilani, A.H. (2006a). In vitro and in vivo anthelmintic activity of *Nicotiana tabacum* L. leaves against gastrointestinal nematodes of sheep. *Phytother. Res.*, 2006. 20(1): 46–48.
 99. Iqbal, Z., Lateef, M., Akhtar, M.S., Ghayur, M.N., Gilani, A.H. (2006b). In vivo anthelmintic activity of ginger against gastrointestinal nematodes of sheep. *J. Ethnopharmacol.*, 2006. 106(2): 285–287.
 100. Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M.N., Afaq, M. (2006). Anthelmintic Resistance: The state of play revisited. *Life Sci.* 79: 2413–2431.
 101. Jabbar, A., Mohandas, N., Jex, A.R., Gasser, R.B. (2013a). The mitochondrial genome of *Protostrongylus rufescens* – implications for population and systematic studies. *Parasit. Vectors* 6: 263.
 102. Jabbar, A., Jex, A.R., Mohandas, N., Hall, R.S., Littlewood, D.T.J., Gasser, R.B. (2013b). The mitochondrial genome of *Aelurostrongylus abstrusus* – diagnostic, epidemiological and systematic implications. *Gene*, 516: 294-300.
 103. Jansen, J., Borgsteede, F.H. (1990). *Dictyocaulus* species, lungworms in cattle and deer in The Netherlands. *Tijdschr. Diergeneesk.* 115: 155-158.

104. Jenkins, E.J., Appleyard, G.D., Hoberg, E.P., Rosenthal, B.M., Kutz, S.J., Veitch, A.M., Schwantje, H.M., Elkin, B.T., Polley, L. (2005). Geographic distribution of the muscle-dwelling nematode *Parelaphostrongylus odocoilei* in North America, using molecular identification of first stage larvae. *J. Parasitol.* 91(3): 574-584.
105. Jex, A.R., Hall, R.S., Littlewood, D.T., Gasser, R.B. (2010). An integrated pipeline for next-generation sequencing and annotation of mitochondrial genomes. *Nuc. Acids Res.* 38(2): 522-533.
106. Johnson, M., Labes, R.E., Taylor, M.J., Mackintosh, C.G., (2003). Efficacy trial of an irradiated cattle lungworm vaccine in red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. Parasitol.* 117: 131-137.
107. Johnson, M., El-Osta, Y.G.A., Hu, M., Gasser, R.B. (2004). An electrophoretic tool for the genetic characterisation and delineation of lungworms. *Mol. Cel. Probes* 18(3): 197-203.
108. Jooste, R. (1990). A checklist of the helminth parasites of the larger domestic and wild mammals of Zimbabwe. *Transactions of the Zimbabwe Scientific Association*, 64(3): 16-32.
109. Jorgensen, R. J., (2002). evidence of the role of *Pilobolus* fungi. *Vet. Parasitol.*
110. Kaplan, R.M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance, a status report. *Trends Parasitol.* 20: 477-481.
111. Kassai, T. (1957). Vizsgálatok a juhok gócos tüdőférfességéről. *Magy Áo Lapja*, 12(3): 66-69.
112. Kassai, T. (1958). A juhok tüdőférgességeinek orvoslása ditrazinfoszfáttal. *Magy Áo Lapja*, 13(1): 9-13.
113. Kassai, T., Shnain, A.H., Kadhim, J.K., Altaif, K.I., Jabbir, M.H. (1972). Nyirok nyérése juhból s ductus thoracicus kanülüzése útján és a módszer alkalmazása *Dictyocaulus filariával* fertőzött gazdáiban. *Magy Áo Lapja*, 17(12): 691-696.
114. Kassai, T. (1989). Anthelmintikumok használata a korszerű állattenyésztésben, különös tekintettel a kérődzők legelői helmintózisaira. *Magy Áo Lapja*, 44(9): 533-539.
115. Kassai, T. (1999). *Veterinary Helminthology*. Butterworth-Heinemann, Oxford. ISBN 0750635630
116. Kassai, T. (2003). *Helmintológia*. Medicina Könyvkiadó, Budapest.
117. Kassai, T., Holló, F. (1960). Vizsgálatok a szarvasmarha- és sertés-tüdőférgesség orvoslásáról. *Magy Áo Lapja*, 15(3): 81-84.
118. Kassai, T., Holló, F. (1962). Vizsgálatok a szarvasmarha-dictyocaulosisról. *Magy Áo Lapja*, 17(7): 257-262.
119. Kassai, T., Holló, F. (1963). A „Loxuran” (dietilkarbamazin-citrát) hatása a juh tüdőférgesire. *Magy Áo Lapja*, 18(4): 163-165.
120. Kassai, T., Kadhim, J.K., Altaif, K.I., Jabbir, M.H. (1974). Vizsgálatok nem besugárzott és besugárzott *Dictyocaulus filaria*-lárvákkal végzett fertőzések immunizáló hatásáról juhan és kecskében. *Magy Áo Lapja*, 29(6): 409-412.

121. Kazlauskas, J. és Puzauskas, R. (1974). On the factors affecting the distribution of roe-deer helminths in Lithuania. *Acta Parasitol. Lituanica* 12: 87-91.
122. Kooyman, F.N., Yatsuda, A.P., Ploeger, H.W., Eysker, M. (2002). Serum immunoglobulin E response in calves infected with the lungworm *Dictyocaulus viviparus* and its correlation with protection. *Parasite Immunol.* 24: 47-56.
123. Kropil, R., Smolko, P., Garaj, P. (2015). Home range and migration patterns of male red deer *Cervus elaphus* in Western Carpathians. *Eur. J. Wildl. Res.* 61: 63-72.
124. Kummeneje, K. (1977). *Dictyocaulus viviparus* infestation in reindeer in northern Norway. A contribution to its epidemiology. *Acta Vet. Scand.* 18: 86-90.
125. Kutzer, E., Sugár, L., Buchacher-Tonitz, S. (1987). Beiträge zur Parasitenfauna der wildlebenden Wiederkäuer Ungarns. I. Zur Parasitenfauna von Rehkitzen und Jungrehen (*Capreolus capreolus*) *Parasit. Hung.* 20: 81-90.
126. Kutzer, E. (1988). Bedeutung Parasitärer Wechsellinfektionen bei Haus- und Wildwiederkäuern. *Monatsschr. Vet. Med.*, 43: 577-580.
127. Larsen, M., 1999. Biological control of Helminths. *Int. J. Parasitol.* 29: 139-146.
128. Larsson, A., Uggla, A., Waller, P.J., Höglund, J. (2011). Performance of second-season grazing cattle following different levels of parasite control in their first grazing season. *Vet. Parasitol.* 175(1-2): 135-40.
129. Levin, I.I., Parker, P.G. (2013). Comparative host-parasite population genetic structures: obligate fly ectoparasites on Galapagos seabirds. *Parasitology* 140: 1061-1069.
130. Li, W.H. (1977). Distribution of nucleotide differences between two randomly chosen cistrons in a finite population. *Genetics* 85: 331-337.
131. Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
132. Linnell, J.D., Andersen, R. (1998). Timing and synchrony of birth in a hider species, the roe deer bucks. *Acta Theriol.* 43: 67-75.
133. Liu, G.H., Wu, C.Y., Song, H.Q., Wei, S.J., Xu, M.J., Lin, R.Q., Zhao, G.H., Huang, S.Y., Zhu, X.Q. (2012). Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene*, 492(1): 110-116.
134. Liu, G.H., Zhou, D.H., Zhao, L., Xiong, R.C., Liang, J.Y., Zhu, X.Q. (2014). The complete mitochondrial genome of *Toxascaris leonina*: Comparison with other closely related species and phylogenetic implications. *Infect. Genet. Evol.* 21: 329-333.
135. Lynch, M., Crease, T.J. (1990). The analyses of population survey data on DNA-sequence variation. *Mol. Biol. Evol.* 7: 377-394.
136. Mason, P. (1994). Parasites of deer in New Zealand. *New Zeal. J. Zool.* 21: 39-47.

137. Matthe, S., Krecek, R.C., Guthrie, A.J. (2002). Effect of management interventions on the helminth parasites recovered from donkeys in South Africa. *J. Parasitol.* 88: 171-179.
138. McCoy, K.D., Boulinier, T., Tirard, C., Michalakis, Y. (2003). Host-dependent genetic structure of parasite populations: differential dispersal of seabird tick host races. *Evolution* 57: 288-296.
139. McKeand, J.B., (1998). Molecular diagnosis of parasitic nematodes. *Parasitology*, 117: S87–S96.
140. McKeand, J.B., (2000). Vaccine development and diagnostics of *Dictyocaulus viviparus*. *Parasitology*, 120: 217–223.
141. Miranda, R.R., Tennessen, J.A., Blouin, M.S., Rabelo, M. (2008). Mitochondrial DNA variation of the dog hookworm *Ancylostoma caninum* in Brazilian populations. *Vet. Parasitol.* 151: 61-67.
142. Molento, M.B. (2009). Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices, *Vet. Parasitol.* 163: 229-234.
143. Molento, M.B., Depner, R.A., Mello, M.H.A. (2006). Suppressive treatment of abamectin against *Dictyocaulus viviparus* and the occurrence of resistance in first-grazing-season calves. *Vet. Parasitol.* 141: 373-376.
144. Morrison, D.A., Höglund, J. (2005). Testing the hypothesis of recent population expansions in nematode parasites of human-associated hosts. *Heredity* 94: 426-434.
145. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70: 3321-3323.
146. Nilsson, O. (1971). The inter-relationship of endo-parasites in wild cervids (*Capreolus capreolus* L. and *Alces alces* L.) and domestic ruminants. *Acta Vet. Scand.* 12: 36-68.
147. Nosanchuk, J.S., Wade, S.E., Landolf, M. (1995). Case report and description of parasite in *Mammomonogamus laryngeus* (human syngamosis) infection. *J. Clin. Microbiol.* 33(4): 998-1000.
148. Panadero, R., Carrillo, E.B., López, C., Díez-Banos, N., Díez-Banos, P., Morrondo, M.P., (2001). Brochopulmonary helminths of roe deer (*Capreolus capreolus*) in the northwest of Spain. *Vet. Parasitol.* 99: 221-229.
149. Panayotova-Pencheva, M., Todev, I., Nanev, V., Tsocheva-Gaytandzhieva, N. (2005). Distribution of nematodes of the family Dictyocaulidae Skrjabin, 1941 in wild ruminants in Bulgaria. *Exp. Pathol. Parasitol.* 81: 14-17.
150. Park, Y.C., Kim, W., Park, J.K. (2011). The complete mitochondrial genome of human parasitic roundworm, *Ascaris lumbricoides*. *Mitochondr. DNA*, 22(4): 91-93.
151. Phan, T.V. (1984). The nematodes parasitizing on animals in Taynguyen Plateau. *Tap. Chi. Sinh. Hoc.* 8(3): 22-29. (vietnám nyelven, angol összefoglaló)
152. Ploeger, H.W. (2002). *Dictyocaulus viviparus*: re-emerging or never been away? *Trends Parasitol.* 18: 329-332.

153. Poinar, G.O. (1983). The Natural History of Nematodes. Prentice-Hall, New Jersey.
154. Posada, D., Buckley, T.R., (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information Criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.* 53(5): 793-808.
155. Posada, D., Keith, A., Crandall, A., (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinf. Appl. Note*, 14(9): 817-818.
156. Priadko, E.I., Baitursinov, K.K. (1984). *Dictyocaulus* infestation of camels in Kazakhstan. *Izvestiia Akademii nauk Kazakhskoi SSR. Seriya Biologicheskaya. Alm Ata: „Nauka“*. 3: 36-38.
157. Price, P.W. (1980). Evolutionary biology of parasites. *Monogr. Popul. Biol.* 15:1-237.
158. Pybus, M.J. (1990). Survey of hepatic and pulmonary helminths of wild cervids in Alberta, Canada. *J. Wildl. Dis.* 26(4): 453-459.
159. Pyziel, A.M. (2014). Molecular analyses of lungworms from European bison (*Bison bonasus*) on the bases of small subunit ribosomal RNA gene (SSU). *Acta Parasit.* 59(1): 122-125.
160. Railliet, A., Henry, A. (1907). Sur les variations des strongyles de l'appareil respiratoire des mammiferes. *C. R. Seances Soc. Biol.* 63: 751-753.
161. Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2092-2100.
162. Rannala, B., Yang, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 43(3): 304-311.
163. Rehbein, S., Lutz, W., Visser, M., Winter, R. (2000). Investigation of the parasite fauna of game animals of North Rhine – Westfalia. 1. Endoparasites of roe deer. *Zeitschr. Jagdwiss.* 46: 248-269.
164. Rehbein, S., Lutz, W., Visser, M., Winter, R. (2001). Investigation of the parasite fauna of game animals of North Rhine – Westfalia. 2. Endoparasites of fallow deer. *Zeitschr. Jagdwiss.* 47: 1-16.
165. Rehbein, S., Lutz, W., Visser, M., Winter, R. (2002). Investigation of the parasite fauna of game animals of North Rhine – Westfalia. 3. Endoparasites of red deer. *Zeitschr. Jagdwiss.* 48: 69-93.
166. Rezac, P., Blazek, K. (1991). Pathological changes in the lungs of deer at the spontaneous infection of nematodes of Protostrongylidae family. *Vet. Med.* 36: 315-320.
167. Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
168. Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darlind, A., Hohna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. (2012). MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Syst. Biol.* 61(3): 539-542.
169. Ruziev, B.K. (2001). On a helminth fauna of desert ecosystems of the southern Uzbekistan. *Parazitologiya. Akademiya Nauk SSSR. Leningrad* 35(2): 162-165.

- 170.Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.
- 171.Samson-Himmelstjerna, G.V., Woidtke, S., Epe, C., Schnieder, T., (1997). Species specific polymerase chain reaction for the differentiation of larvae from *Dictyocaulus viviparus* and *Dictyocaulus eckerti*. *Vet. Parasitol.* 68: 119-26.
- 172.Schnieder, T. (1993). The diagnostic antigen encoded by gene fragment (Dv3-14: a major sperm protein of *Dictyocaulus viviparus*. *Int. J. Parasitol.* 23: 383-389.
- 173.Schnieder, T., Epe, C., Samson-Himmelstjerna, G.V., (1996). Species differentiation of lungworms (Dictyocaulidae) by polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism of second internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Parasitol. Res.* 82: 392-4.
- 174.Skog, A., Zachos, F.E., Rueness, E.K., Feulner, P.G.D., Myserud, A., Langvatn, R., Lorenzini, R., Hmwe, S.S., Lehoczy, I, Hartl, G.B., Stenseth, N.C., Jakobsen, K.S. (2009). Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *J. Biogeogr.* 36: 66-77.
- 175.Skrjabin, K.I., (1931). Dictyocauliasis of cattle in the USSR. In russian. *Veterinarnyi Spetsialist na Sotsialisticheskoy Stroike.* 19: 23-32.
- 176.Skrjabin, K.L., Shikhobalova, N.P., Schulcz, R.S., Popova, T.I., Boev, S.N., Delyamure, S.L. (1952). In Skrjabin K.I. (Szerk.) Key to the Parasitic Nematodes, Vol. 3, Strongylata. *Akademyia Nauk SSSR.*
- 177.Skrjabin, K.L., Shikhobalova, N.P., Schulcz, R.S. (1954). Dictyocaulidae, Helimosomatidae and Ollulanidae of animals. In Skrjabin K.I. (Szerk.) *Essentials of Nematology*, Vol. 4. *Akademyia Nauk SSSR.*
- 178.Slatkin, M., Hudson, R.R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- 179.Somers, C. J. (1985). The presence of infective larvae of *Dictyocaulus viviparus* inside sporangia of the fungus *Pilobolus kleinii*. *Ir. J. Agr. Res.*, 24: 127-128.
- 180.Sommer, R.S., Zachos, F.E., Street, M., Joris, O., Skog, A., Benecke, N. (2008). Late Quaternary distribution dynamics and phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *Quat. Sci. Rev.* 27: 714-733.
- 181.Sprehn, C.E.W. (1932). *Lehrbuch der Helminthologie.* Verlag von Gebrüder Borntraeger, Berlin 739-741.
- 182.Stafford, K.J. (1991). A review of diseases of parasites of the Kafue lechwe (*Kobus lechwe kafuensis*). *J. Wildl. Dis.* 27(4): 661-667.
- 183.Stefancikova, A. (1999). Lung nematodes in chamois (*Rupicapra rupicapra rupicapra*) of the Slovak Paradise National Park. *Acta Parasit.* 44: 255-260.
- 184.Stoican, E. és Olteanu, G. (1959). Contributii la studii helmintofaunei caprioarei (*Capreolus capreolus*) in R.P.R. *Probl. Paraz. Vet. Inst. Pat. Igiene Anim. Bucuresti* 7: 38-46.
- 185.Strube, C., Haake, C., Sager, H., Weber, S.S., Kaminsky, R., Buschbaum, S., Joekel, D., Schicht, S., Kremmer, E., Korrell, J., Schnieder, T., Samson-Himmelstjerna, G. (2015). Vaccination with recombinant paramyosin against

- the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus* considerably reduces worm burden and larvae shedding. *Parasit. Vectors* 2015(8): 119.
186. Sugár, L. (1990). Lungworm disease outbreaks in fenced red deer herds. *Transaction the Congr. 19. IUGB. Trondheim. 1989*: 221-223.
 187. Sugár, L. (1994). Importance of lungworm infections in deer (Cervidae) and their control. Recent Developments in Deer Biology. Proceedings of the third international congress on the biology of deer. 28 August – 2 September, 1994 Edinburgh, UK. J.A. Milne (szerk.). 315.
 188. Sugár, L. (1995). A szarvasfélék tüdőféreg-fertőzöttségének a jelentősége és a védekezés lehetőségei. *Magy Áo Lapja*, 50: 161-164.
 189. Sugár, L. (1997). Deer and their parasites: disease or coexistence? *Parassitologia*, 39: 297-301.
 190. Sugár, L., Ács, Z., Kovács, Sz., Kovács, A. (2006). Szarvasok, paraziták és más apróságok a legelőn – egy soktényezős, változatos biocönózis. *Gyepgazdálkodási Közlemények* 4: 33-37.
 191. Sugár, L., Kőrös, A. (2000). Bakonyi gímszarvasok tüdőféreg-fertőzöttsége. *Akadémiai Beszámolók: parazitológia, halkórtan, MTA*, 27: 11.
 192. Sugár, L., Sárközy, P. (1988). Lungworm control with Albendazole (Vermidan) in captive red deer herds. *S. Verh. 30. Int. Symp. Erkr. Zoo- und Wildtiere. Sofia, 1988. Akademie-Verlag Berlin*: 149-152.
 193. Sweanor, P.Y., Sandegren, F. (1989). Winter-range philopatry of seasonally migratory moose. *J. Appl. Ecol.* 26: 25-33.
 194. Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
 195. Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.
 196. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
 197. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acids Res.* 25: 4876–4882
 198. Umur, S., Gürler, A.T., Bölükbas, C.S., Acici, M. (2012). First record of *Dictyocaulus capreolus* (Gibbons and Höglund 2002) in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Turkey. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 59: 303-305.
 199. Xia, X. (2013). DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 30(7): 1720-1728.
 200. Vercruysse, J., Dorny, P., Claerebout, E., Weatherley, A.J. (1998). Field evaluation of a topical doramectin formulation for the chemoprophylaxis of parasitic bronchitis in calves. *Vet. Parasitol.* 75: 169-179.
 201. von Holtum, C. (2006). Immunreaktion im Kalb auf das rekombinante Major Sper Protein von *Dictyocaulus viviparus* als Glutathion-S-Transferase

Fusionprotein. InagruL-Dissertation aus dem Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (www.elibtioho-hannover.de/dissertations/holtume_ws06.pdf).

202. Wimmer, B., Craig, B.H., Pilkington, J.G., Pemberton, J.M., (2003). Non-invasive assessment of parasitic nematode species diversity in wild Soay sheep using molecular markers. *Int. J. Parasitol.* 34, 625-631.
203. Woolley, H. (1997). The economic impact of husk in dairy cattle. *Cattle Pract.* 5: 315-317.
204. Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 15: 323-354.
205. Wyk, J.A., Gerber, H.M., Villiers, F.J. (2000). Parenterally administered gastrointestinal nematode infective larvae viable after more than 15 years in liquid nitrogen. *Vet. Parasitol.* 88: 239-247.
206. Zhu, X., Spratt, D.M., Beveridge, I., Haycock, P., Gasser, R.B. (2000). Mitochondrial DNA polymorphism within and among species of *Capillaria* sensu lato from Australian marsupials and rodents. *Int. J. Parasitol.* 30: 933-938.

12. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉBŐL MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Idegen nyelvű közlemény

Ács Z., Hayward A., Sugár L. (2016). Genetic diversity and population genetics of large lungworms (*Dictyocaulus*, Nematoda) in wild deer in Hungary. Parasitology Research, DOI: 10.1007/s00436-016-5088-0. (IF=2,027)

Magyar nyelvű közlemények

Sugár L., Ács Z., Kovács Sz., Kovács A. (2006). Szarvasok, paraziták és más apróságok a legelőn – egy soktényezős, változatos biocönózis. In: Vinczeffy I. (szerk.): Gyepgazdálkodási Közlemények. Az MTA Agrártudományok Osztálya, Gyepgazdálkodási Bizottság Tudományos Folyóirata 4: p. 33-37.

Ács Z., Sugár L. (2016). A kérődzők nagy tüdőférgessége (dictyocaulosis). Magyar Állatorvosok Lapja 138(4): p. 219-230. (IF=0,212)

Konferencia kiadványban megjelent absztraktok idegen nyelven

Ács Z., Sugár L., Péntes Zs. (2006). ITS2 sequences of *Dictyocaulus* lungworms from red and fallow deer in Hungary: molecular evidences for a new genotypes. In: Ludek Bartoš, Adam Dušek, Radim Kotrba, Jitka Bartošová-Víchová (Szerk.) Advances in Deer Biology, Deer in a changing world. Proceedings of the 6th International Deer Biology Congress. Prága, Cseh Köztársaság, 2006. 08. 7-11.: p. 78.

Sugár L., Kovács Sz., Ács Z. (2007). Certain parasites and other invertebrates on the deer pasture: a unique biocenosis. In: 1st

International Conference on Genus *Cervus*. Fiera di Primiero, Olaszország, 2007. 09. 14-17.

Ács Z., Sugár L. (2011). *Dictyocaulus* lungworms in red, fallow and roe deer: molecular evidences for a new species. In: Puigcerver, M., Domingo, J., Buner, F. (Szerk..) XXX IUGB Congress (International Union of Game Biologists) and Perdix XIII. Barcelona, Spanyolország, 2011. 09. 05-09.: p. 275.

Ács Z., Sugár L. (2014). Molecular characteristics of *Dictyocaulus* Lungworm Species in deer. In: Jianzhang Ma, Minghai Zhang, Richard Halbrook, Bingwan Liu, Weiqi Zhang (szerk.) Proceeding of the 8th International Deer Biology Congress and International Wildlife Management Symposium, Northeast Forestry University. Harbin, Kína, 2014. 07. 27-31.: p. 19-20.

Előadások

Ács Z., Sugár L. (2008). *Dictyocaulus* fajok genetikai változatossága, életsiklusa és ökológiai kapcsolatai. Magyar Parazitológusok Társasága, 2008. 11. 14.

Ács Z., Sugár L. (2010). Hazai szarvasfélék tüdőférgének genetikai változatossága. Magyar Biológiai Társaság, Állattani Szakosztály, 986. előadóülés, 2010. 10. 06.

Ács Z., Sugár L. (2011). Hazai szarvasfélék nagy tüdőférgének (*Dictyocaulidae*, Nematoda) gazdafajlagossága. Doktoranduszok Kaposvári Workshopja. 2011. 06. 08.

Ács Z., Sugár L. (2015). A szarvasfélék nagy tüdőférgének (*Dictyocaulus* spp.) genetikai változatossága. Magyar Parazitológusok Társasága 50 éves Jubileumi Emlékülése, 2015. 06. 03.

13. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉN KÍVÜLI PUBLIKÁCIÓK

Idegen nyelvű közlemények

- Ács, Z., Melika, G., Kaló, P., Kiss, G. B. (2002). Molecular analysis in *Eurytoma rosae* species-group (Hymenoptera: Eurytomidae). pp. 234-240. In: Melika, G. & Thuróczy, Cs. (Szerk.) Parasitic Wasps: Evolution, Systematics, Biodiversity and Biological Control. Agroinform, Budapest.
- Pujade-Villar, J., Melika, G., Ros-Farré, P., Ács, Z., Csóka, Gy. (2003). Cynipid inquiline wasps of Hungary, with taxonomic notes on the Western Palaearctic fauna (Hymenoptera: Cynipidae, Cynipinae, Synergini). Folia Entomol. Hungar. 64: 121-170.
- Melika, G., Ács, Z., Bechtold, M. (2004). New species of cynipid inquelines from China (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini). Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 50(4): 319-336. IF: 0.152.
- Hale, M.L., Ács, Z. and Stone, G.N. (2004). Polymorphic microsatellite loci in *Eurytoma brunniventris*, a generalist parasitoid in oak cynipid galls. Molecular Ecology Notes 4: 197-199. IF: 1.145.
- Melika, G., Ros-Farré, P., Péntzes, Zs., Ács, Z., Pujade-Villar, J. (2005). *Ufo abei* Melika et Pujade-Villar (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini) new genus and new species from Japan. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 51(4): 313-327. IF: 0.152
- Keszthelyi, S., Ács, Z. (2005). Comparison on DNA patterns of different ecotypes of European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hübner) in Hungary. Acta Biologica Hungarica 56 (1-2): 75-81. IF: 0.309.
- Sadeghi, S. E., Melika, G., Pujade-Villar, J., Péntzes, Zs., Ács, Z., Bechtold, M., Assareh, M.H., Tavakoli, M., Yarmand, H., Askary, H., Stone, G.N., Azizkhani, E., Zargaran, M. R., Aligolizade, D., Barimani, H., Dordaei A. A. (2006). Oak cynipid gall inquelines of Iran (Hym.: Cynipidae: Synergini), with description of new species. Journal of the Entomological Society of Iran
- Ács, Z., Melika, G., Péntzes, Zs., Pujade-Villar, J., Stone, G.N. (2007). The phylogenetic relationships between *Dryocosmus*, *Chilaspis* and allied genera of oak gallwasps (Hymenoptera, Cynipidae: Cynipini). Systematic Entomology 32: 70-80. IF: 2.426
- Stone, G. N., Atkinson, R. J., Rokas, A., Nieves-Aldrey, J. L., Melika, G., Ács, Z., Csóka, Gy., Hayward, A., Bailey, R., Buckee, C., McVean, G. A. T. (2007). Evidence for widespread cryptic sexual generations in apparently purely asexual Andricus gallwasps. Molecular Ecology. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03573.x. IF: 5.169
- Ács, Z., Challis, R. J., Bihari, P., Blaxter, M., Hayward, A., Melika, G., Csóka, Gy., Péntzes, Zs., Pujade-Villar, J., Nieves-Aldrey, J. L., Schönrogge, K., Stone, G. N. (2010). Phylogeny and DNA barcoding of inquiline oak

- gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Western Palaearctic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 210-225. IF: 3.556.
- Bertin, S., Piccau, L., Ács, Z., Alma, A., Bosco, D. (2010). Molecular differentiation of four *Reptalus* species (Hemiptera: Cixiidae). *Bulletin of Entomological Research*, doi:10.1017/S0007485309990605. IF: 1,58
- Bertin, S., Picciau, L., Ács, Z., Alma, A., Bosco, D. (2010). Molecular identification of the *Hyalesthes* species (Hemiptera: Cixiidae) occurring in vineyard agroecosystems. *Annals of Applied Biology*, 157(3):435-445. IF: 1,96
- Ember, I., Ács, Z., Munyaneza, E. J., Crosslin, J.M., Kolber, M. (2011). Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. *European Journal of Plant Pathology* 130(3): 367-377. IF: 1,71
- Jović, J., Ember, I., Mitrović, M., Cvrković, T., Krstić, O., Krnjajić, S., Ács, Z., Kolber, M., Toševski, I. (2011). Molecular detection of potato stolbur phytoplasma in Serbia. *Bulletin of Insectology*. 64: S83-S84. IF: 1,49
- Ács, Z., Jović, J., Ember, I., Cvrković, T., Nagy, Z., Talaber, C., Gergely, L., Toševski, I., Kolber, M. (2011). First report of Maize redness disease in Hungary. *Bulletin of Insectology*. 64: S229-S230. IF: 1,49
- Ember, I., Ács, Z., Salar, P., Danet, J. L., Foissac, X., Kölber M., Melambic-Maher, S. (2011). Survey and genetic diversity of phytoplasmas from the 16SrV-C and D subgroups in Hungary. *Bulletin of Insectology*. 64: S240-S241. IF: 1,49
- Camerota, C., Raddadi, N., Pizzinat, A., Gonella, E., Crotti, E., Tedeschi, R., Mozes-Daube, N., Ember, I., Ács, Z., Kolber, K., Zchori-Fein, E., Daffonchio, D., Alma, A. (2012). Incidence of ‘*Candidatus Liberibacter europaeus*’ and phytoplasmas in *Cacopsylla* species (Hemiptera: Psyllidae) and their host/shelter plants *Phytoparasitica*. 40(3). DOI:10.1007/s12600-012-0225-5. IF: 0,9
- Kolics, B., Ács, Z., Chobanov, D. P., Orci, K. M., Qiang, L. S., Kovács, B., Kondorosy, E., Decsi, K., Taller, J., Specziár, A., Orbán, L., Müller, T. (2012). Re-visiting phylogenetic and taxonomic relationships in the genus *Saga* (Insecta: Orthoptera). *PLoS ONE*. 7(11). DOI:10.1371/annotation/90f45dc4-e2ab-4727-8278-2787c215bc61. IF: 3,23
- Ács, Z., Kovács, D. (2013). Phylogenetic patterns of a nightingale population in a contact zone of *Luscinia megarhynchos* and *L. luscinia* in Hungary. *North-Western Journal of Zoology* 9 (2): 365-373. IF: 0,9
- Erezyilmaz, D. F., Hayward, A., Huang, Y., Paps, J., Ács, Z., Delgado, J. A., Collantes, F., Kathirithamby, J. (2014). Expression of the pupal determinant broad during metamorphic and neotenic development of the Strepsipteran *Xenos vesparum* Rossi *PLoS ONE*. 9(4): e93614. DOI:10.1371/journal.pone.0093614. IF: 3,23

Magyar nyelvű közlemények

- Ács Z., Melika G., Mikó I. (2003). A biológiai védekezésben használt trichogrammák taxonómiai problémái (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Növényvédelem* 39(12): 613-616.
- Mikó I., Melika G., Ács Z., Bechtold M. (2003). Gradáció előtt a káposztamoly? *Magyar Mezőgazdaság* 58(4), *Növények védelme* 2003/1: 22-23.
- Ács Z., Keszthelyi S. (2004). Magyarországi kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis* Hübner) populációk genetikai (DNS) vizsgálata. *Acta Agronomica Óváriensis* 46 (1): 59-66.

Konferencia kiadványban megjelent absztraktok idegen nyelven

- Ács Z., Thuróczy, Cs., Melika, G. (2002). RAPD examination in *Eurytoma rosae* species-group (Hymenoptera: Eurytomidae). p. 23. In: International Symposium Parasitic Hymenoptera: Taxonomy and Biological Control. 14-17 May 2001, Kőszeg, Hungary.
- Ács Z., Melika, G. (2002). Review of world fauna of inquiline cynipid wasps (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini and Figitidae: Thrasorinae). p.60. In: 5th International Conference of Hymenopterists (Beijing, China, July 22-26,2002). Programme & Abstracts. Beijing.
- Mikó, I., Ács Z., Melika, G., Bechtold, M. (2002). Role of Parasitoids in Control of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) in: International Symposium of IOBC. 17-20. Sept. 2002, Csopak.
- Melika, G., Péntes, Z., Mikó, I., Csóka, Gy., Hirka, A., Ács Z., Bechtold, M. (2005). Parasitoid community structures of two invading blacklocust leaf-miners, *Parectopa robiniella* & *Phyllonorycter robiniella* in Hungary. Pp. 140-148. in: 25th Jubilee Assembly of East Palearctic Regional Section of IOBC. 07-11. June 2005, Budapest. ISBN 963 218 605 2.
- Melika, G., Péntes, Zs., Mikó, I., Csóka, Gy., Hirka, A., Bechtold, M., Ács Z. (2006). Role of parasitoids in animal invasion: *Phyllonorycter robiniella* and *Parectopa robiniella* in Europe and their parasitoids. 6th International Conference of Hymenopterists. Sun City, South Africa, 22 – 27 January 2006. Programme and Abstracts. Pp. 41-42.
- Melika, G., Péntes, Zs., Ács Z., Stone, G. N., Pujade-Villar, J. (2006). Phylogenetic relationship between *Dryocosmus* -- *Chilaspis* and allied genera of oak gallwasps (Hymenoptera, Cynipidae: Cynipini). 6th International Conference of Hymenopterists. Sun City, South Africa, 22 – 27 January 2006. Programme and Abstracts. p. 22.
- Melika, G., Kfir, R., Mikó, I., Bechtold, M., Ács Z. (2006). Population dynamics of *Plutella xylostella* and its parasitoids in South Africa and Hungary 6th International Conference of Hymenopterists. Sun City, South Africa, 22–27 Jan. 2006. Programme and Abstracts. p. 41.
- Ács Z., Péntes, Zs., Melika, G., Stone, G.N., Pujade-Villar, J. (2006). Molecular phylogeny of Synergini inquiline cynipid wasps (Hymenoptera: Cynipidae). 6th International Conference of

- Hymenopterists. Sun City, South Africa, 22 – 27 Jan. 2006. Programme and Abstracts. p. 8.
- Pénzes, Zs., Melika, G., Bihari, P., Szabó, K., Ács, Z., Pujade-Villar, J., Stone, G.N., Mikó, I. és Somogyi, K. (2006). Genetic variability of a cynipid inquiline wasp *Synergus umbraculus* (Hymenoptera: Cynipidae). 6th International Conference of Hymenopterists. Sun City, South Africa, 22 – 27 January 2006. Programme and Abstracts. p. 25.
- Bertin, S., Picciau, L., Ács, Z., Alma, A., Bosco, D. (2009). Molecular markers provide new tools for the identification of *Hyalesthes* and *Reptalus* species (Hemiptera: Cixiidae). 5th European Hemiptera Congress, 31 August – 4 September 2009 Velence, Hungary
- Ács, Z., Ember, I., Contaldo, N., Nagy, Z., Bertaccini, A., Kölber, M. (2010). Tuf-type characterization of Hungarian stolbur strains from different host species. COST Action FA 0807: “Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management. Sitges, Spain, February 1st and 2nd 2010.
- Süle, S., Ember, I., Kiss, E., Ács, Z., Kölber, M. (2010). Endophytic bacteria in phytoplasma infected bindweeds. COST Action FA 0807: “Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management. Sitges, Spain, February 1st and 2nd 2010.
- Ember, I., Ács, Z., Nagy, Z., Mike, Á., Kölber, M. (2010). Study of stolbur phytoplasma tuber transmission in potato. COST Action FA 0807: “Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management. Sitges, Spain, February 1st and 2nd 2010.
- Bertin, S., Picciau, L., Ács, Z., Alma, A., Bosco, D. (2010). Molecular identification of *Hyalesthes* and *Reptalus* species (Hemiptera: Cixiidae) allows monitoring of vector species throughout the year. COST Action FA 0807: “Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management. Sitges, Spain, February 1st and 2nd 2010.

Konferencia kiadványban megjelent absztraktok magyar nyelven

- Ács Z., Melika G., Kaló P., Kiss Gy. B. (2002). Az *Eurytoma* “*rosae*” fajcsoport DNS vizsgálata. p. 27. In: Kuroli, G., Balázs, K. & Szemessy, Á. (szerk.) 48. Növényvédelmi Tudományos Napok (48th Plant Protection Days, Budapest, March 6-7.). Budapest.
- Ács Z., Melika G., Mikó I., Bechtold M. (2003). Parazitoid fürkészdarázsak szerepe a *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) elleni védekezésben. p. 35. In: 49. Növényvédelmi Tudományos Napok. Budapest.
- Melika G., Ács Z., Mikó I., Triapitzyn S. A. (2003). A biológiai védekezésben használt Trichogrammák taxonómiai problémái (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). p. 60. In: 49. Növényvédelmi Tudományos Napok. Budapest.

- Mikó I., Melika G., Ács Z. (2003). “Nem *Trichogramma*” peteparazitoid fűrészdarazsak szerepe a biológiai védekezésben (irodalmi áttekintés). p. 63. *In:* 49. Növényvédelmi Tudományos Napok. Budapest.
- Keszthelyi S., Ács Z. (2004). Magyarországi kukoricamoly (*Ostrinia nubilais* Hübner) populációk genetikai vizsgálata. p. 44. *In:* 50. Növényvédelmi Tudományos Napok. 50th Plant Protection Days, Budapest, Febr. 24-25.). Budapest.
- Ács Z., Melika G., Mikó I. (2004). Parazitoidok alkalmazása biológiai védekezésben. TOX'2004 Konferencia, 2004. október 14-16. Harkány. Kivonatok.

14. SZAKMAI ÉLETRAJZ

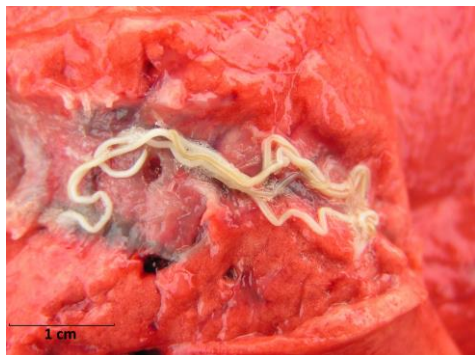
1975-ben születtem Ajkán. Középiskolai tanulmányaimat az ajkai Bródy Imre Gimnáziumban végeztem. 1995-től 2000-ig a Szegedi Tudományegyetem hallgatója voltam, ahol 2001-ben biológus (ökológia specializációval) diplomát szereztem. 2000-2004. között a soproni Nyugat-Magyarországi Egyetem vadgazda-mérnök szakán levelező tagozatos hallgató voltam, ahol 2005-ben szereztem vadgazda-mérnök oklevelet. 2009-2012. között a Kaposvári Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola hallgatója voltam. 2000-ben angol nyelvből középfokú „C”-típusú nyelvvizsgát, 2015-ben német nyelvből alapfokú „B”-típusú nyelvvizsgát szereztem. 2001-től-2007-ig a Vas Megyei Növény- és Talajvédelmi Szolgálat, Rovar Parazitológiai Laboratóriumában, Kőszeg illetve Tanakajdon, rovar-parazitológus munkakörben dolgoztam. 2007-től 2015-ig a Fitolab Növényi Diagnosztikai és Szolgáltató Kft-nél biológusként dolgoztam. Tanulmányutakon vettem részt az alábbi intézetekben: Schmalhausen Institute of Zoology Kijev, Edinburgh University, Oxford University, Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade (IPPE), University of Torino, University of Bologna, University of Bordeaux (INRA).

A Vénic Természetismereti és Természetvédelmi Alapítványnak 2006-tól a mai napig kuratóriumi elnöke vagyok, ahol elsősorban a védett fajokkal kapcsolatban végzek természetvédelmi felméréseket.

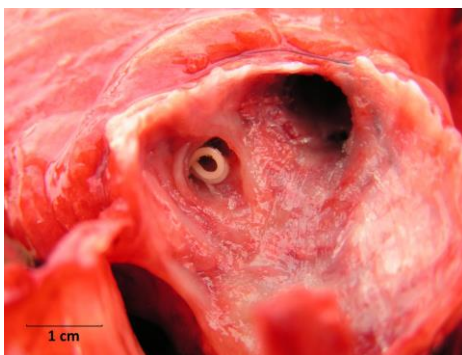
Szakmai érdeklődési területek: parazita férgek, rovarok általános és genetikai biodiverzitás, filogenetika, populációgenetika, természetvédelem, biológiai védekezés.

15. MELLÉKLETEK

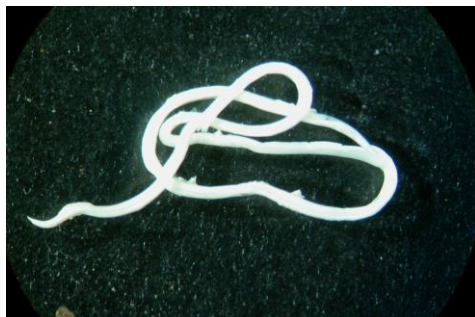
1. melléklet



1. kép. Nagy tüdőférges a felnyitott hörgőben.



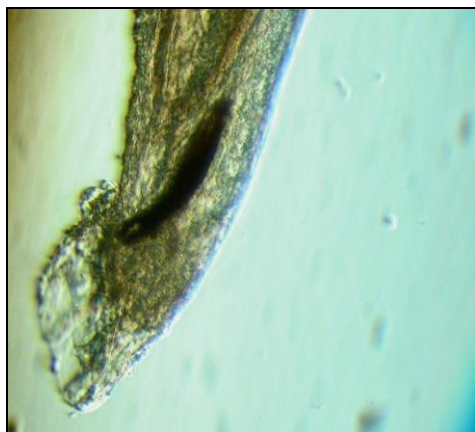
2. kép. Tüdőféreg gímszarvas tüdejének hörgőjében.



3. kép. Nőstény *Dictyocaulus*.



4. kép. Hím *Dictyocaulus*.



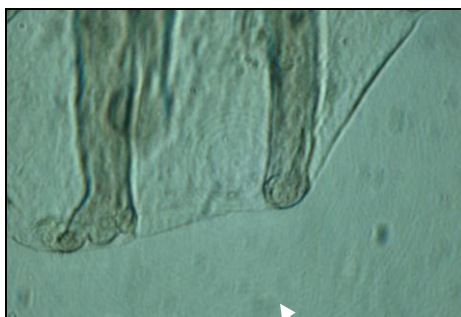
5. kép. Hím *Dictyocaulus* farki vége oldalnézetből.



6. kép. *Dictyocaulus* párzótasakja a bordákkal.



7. kép. Páros párizóhorog (spiculum).



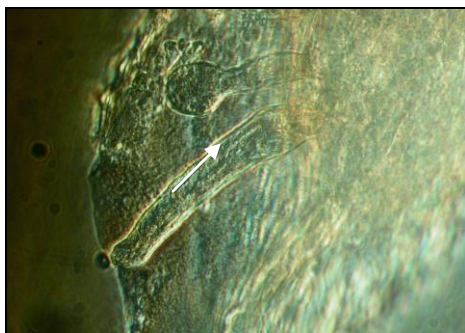
8. kép. Dorzális borda végén 3 kis lebennyel.



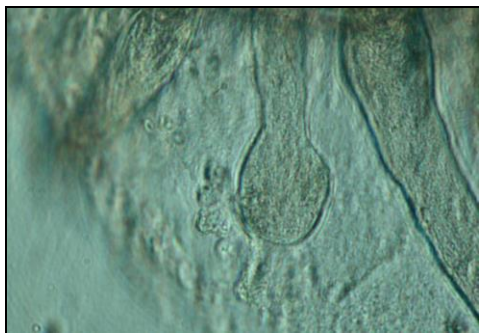
9. kép. Párizótasak bordái és tapogatók



10. kép. Gömbölyű végű tapogatók és bordák.



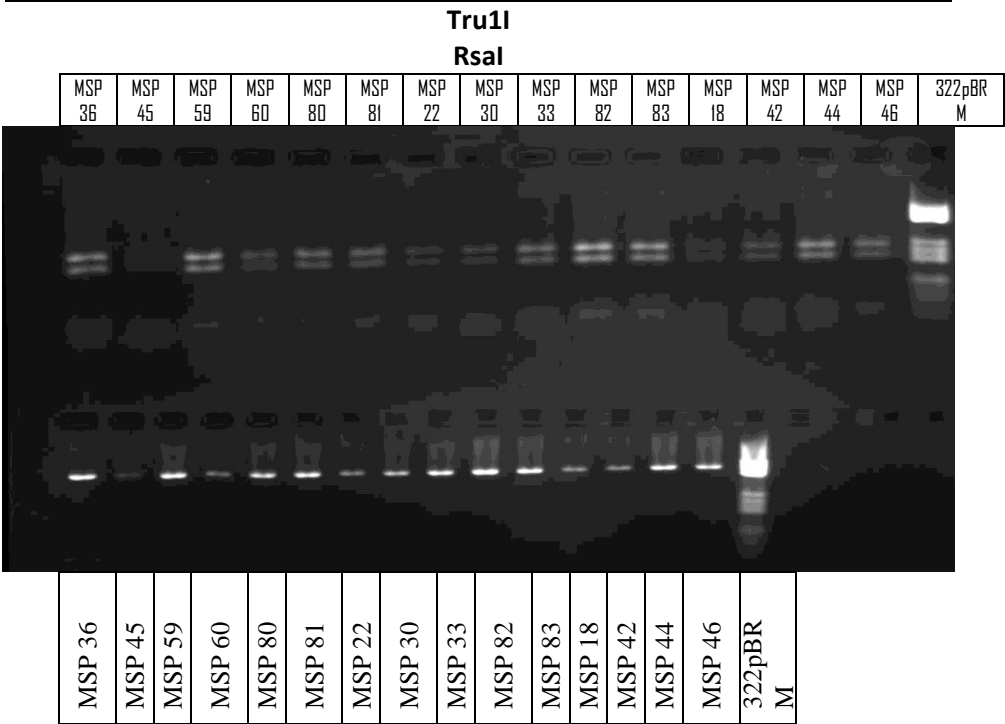
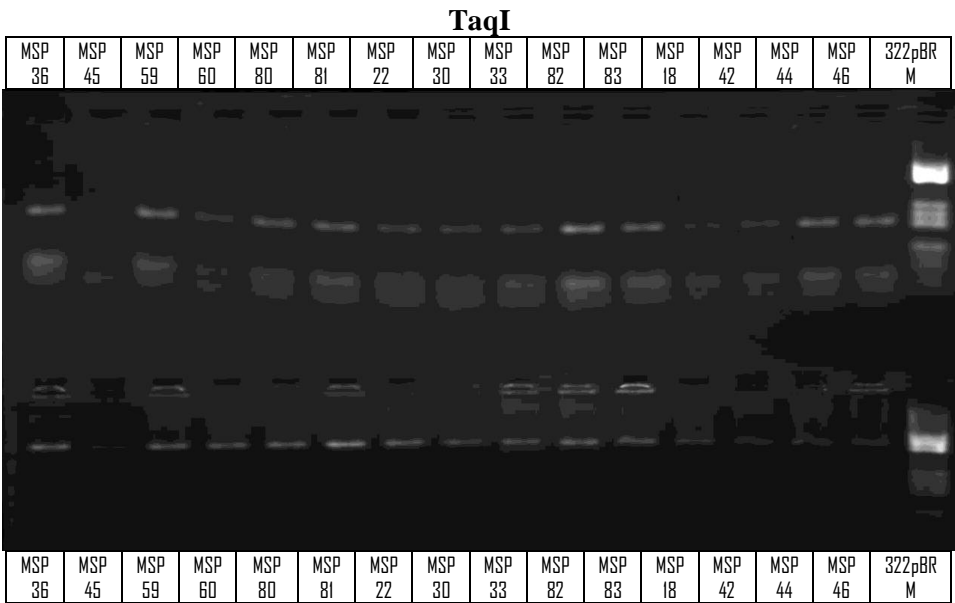
11. kép. Tapogató és borda oldalnézetből.



12. kép. Egy tapogató kinagyítva.

2. melléklet

PCR-RFLP gélfotók. *Dictyocaulus* férgek MSP1 PCR termékek, elektroforézis: 3%-os agaróz gélben, festés: etídium-bromid.



SspI